Série A, N° Orsay
N° d'ordre : 2

THÈSES

PRÉSENTÉES
A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
CENTRE D'ORSAY
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Janine BEISSON-SCHECROUN

Première Thèse

INCOMPATIBILITÉ CELLULAIRE ET INTERACTIONS NUCLÉOCYTOPLASMIQUES DANS LES PHÉNOMÈNES DE "BARRAGE"

Chez le *PODOSPORA ANSERINA*

Deuxième Thèse : Propositions données par la Faculté

Soutenues le 1961 devant la Commission d'Examen

M M. B. EPHRUSSI Président.
Ph. L'HÉRITIER } Examinateurs.
G. RIZET }

L'EXPANSION — EDITEUR

Série A, N° Orsay
N° d'ordre : 2

THÈSES

PRÉSENTÉES
A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
CENTRE D'ORSAY
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Janine BEISSON-SCHECROUN

Première Thèse

INCOMPATIBILITÉ CELLULAIRE ET INTERACTIONS NUCLÉOCYTOPLASMIQUES DANS LES PHÉNOMÈNES DE "BARRAGE"

Chez le *PODOSPORA ANSERINA*

Deuxième Thèse : Propositions données par la Faculté

Soutenues le devant la Commission d'Examen

M M. B. EPHRUSSI Président.
Ph. L'HÉRITIER } Examinateurs.
G. RIZET }

L'EXPANSION — EDITEUR

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen

M. H. ZAMANSKY.

Professeurs

MM.	G. JULIA.	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
	DE BROGLIE.	T Théories physiques.
	PRENANT.	T Anatomie et Histologie comparées.
	PERES.	T Mécanique des fluides et applications.
	GRASSÉ.	T Evolution des êtres organisés.
	PRÉVOST.	T Chimie organique.
	CHAUDRON.	T Chimie appliquée.
	WYART.	T Minéralogie et Cristal.
	TEISSIER.	T Zoologie.
	MANGENOT.	T Biologie Vég. (Orsay).
	AUGER.	T Physique quantique et Relativité.
	MONNIER.	T Physiologie générale.
	PIVETEAU.	T Paléontologie.
	ROCARD.	T Physique (E.N.S.).
	CARTAN.	T Mathématiques (E.N.S.).
	LAFFITTE.	T Chimie générale.
	FAVARD.	T Géométrie supérieure.
	COULOMB.	T Physique du Globe.
Mlle	COUSIN.	T Biologie animale (S.P.C.N.).
MM.	CHRÉTIEN.	T Chimie minérale.
	DRACH.	T Zoologie.
	KASTLER.	T Physique (E.N.S.).
	EPHRUSSI.	T Génétique.
	RIVIÈRE.	T Géologie SPCN et sédiment.
	GAUTHERET.	T Biologie vég. (P.C.B.).
	LUCAS R.	T Recherches physiques.
	THOMAS A.	T Biologie cellulaire.
	ARNULF.	T Optique appliquée.
	MORAND.	T Physique Enseignement.
	SOLEILLET.	T Physique (P.C.B.).
	FORTIER.	T Mécanique exp. des fluides.
	DANJON.	T Astronomie.
	PETIT.	T Biologie maritime.
	QUENEY.	T Météorologie et dynamique atmosphérique.
	GALLIEN.	T Embryologie.
	EICHHORN.	T Botanique.
	DE CUGNAC.	T Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mlle	CAUCHOIS.	T Chimie physique.
MM.	THELLIER.	T Physique du globe.
	L'HÉRITIER.	T Biologie générale (Orsay).
	GRIVET.	T Radioélectricité (Orsay).
	PONCIN.	T Mécanique générale.
	DUBREIL.	T Arithmétique et théorie des nombres.
	QUELET.	T Chimie organique.
	CAGNIARD.	T Géophysique appliquée.
	CHAMPETIER.	T Chimie macromoléculaire.
	CUVILLIER.	T Micropaléontologie.
	JUNG.	T Pétrographie.
	TRILLAT.	T Microscopie et diffraction électronique.
	WIEMANN.	T Chimie organique et struc.
	JACQUINOT.	T Spectroscopie et physique céleste (Orsay).
	VASSY.	T Physique de l'atmosphère.
	DESTOUCHES.	T Théories physiques.
	AMIEL.	T Chimie générale.
	HOCART.	T Minéralogie et cristallog.
	MATHIEU J.-P.	T Physique (optique).
	COUTEAUX.	T Biologie animale (P.C.B.).
	MAY.	T Zoologie (Orsay).
	CHOQUET.	T Théorie des fonctions et Topologie.
	FELDMANN.	T Biologie végétale marine.
	GUINIER.	T Physique des solides (Orsay).
	JOST.	T Physiologie comparée.
	FORTET.	T Calcul des Probabilités et Physique mathématique.
	SCHWARTZ.	T Calcul diff. et intégral.
	CHOUARD.	T Physiologie végétale.
	MALAVARD.	T Aviation (techn. aéronautique).
	BRELOT.	T Calcul diff. et intégral.
	NORMANT.	T Synthèse organique générale.
	BENARD.	T Chimie minérale.
	BUVAT.	T Botanique (E.N.S.).
	DUGUE.	T Statistiques mathématiques.
	SOULAIRAC.	T Psychophysiologie.
	ULRICH.	T Physiologie végétale.
	MARÉCHAL.	T Optique théorique et appl.
	KIRRMANN.	T Théories chimiques.
	CHADEFAUD.	T Botanique.
Mlle	LE BRETON.	T Physiologie de la nutrition.
MM.	SALEM.	T Mathématiques générales.
	LELONG.	T Applic. de l'analyse à la géométrie.
	DEVILLERS.	T Anatomie et Histologie comparées.
	EHRESMANN.	T Topologie algébrique.
	FRANÇON.	T Physique (S.P.C.N.).
	GLANGEAUD.	T Géographie phys. et Géologie dynamique.
	GODEMENT.	T Mathématiques (M.P.C.).
	PISOT.	T Tech. Mathém. de la Phys.
	ROCH.	T Géologie.
	SCHATZMAN.	T Astrophysique.
	TERMIER.	T Paléontologie stratig.
	ZAMANSKY.	T Mathématiques générales.
	LENNUIER.	T Physique (M.G.P.).
	RIZET.	T Génétique (Orsay).
	ROUTHIER.	T Géologie appliquée.
Mme	TONNELAT.	T Physique théorique.
MM.	DIXMIER.	T Mathématiques (M.P.C.).
	SOUCHAY.	T Chimie générale.
	AIGRAIN.	T Electrotechnique générale.
	BRUSSET.	T Chimie systématique.
	LÉVY M.	T Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
Mme	CHAIX.	T Chimie biologique.
Mme	HUREL-PY.	Biologie végétale (P.C.B.).
MM.	PIAUX.	T Chimie (M.P.C.).
	BRUN.	T Mécan. théorique des fluides.
	LEDERER.	T Chimie biologique.
Mme	DUBREIL.	T Mathématiques (Agrégation).
Mme	LELONG.	T Mathématiques (E.N.S.).
MM.	BELLAIR.	T Géologie (S.P.C.N.).
	COTTE.	T Physique électricité.
	DUBOIS J. E.	T Chimie organique.
	LAMOTTE.	T Zoologie (E.N.S.).
	MICHEL A.	T Chimie minérale (Orsay).
	OLMER.	T Energétique générale.
	ROUAULT.	T Electricité (Orsay).
	GAUTHIER.	T Mécanique appliquée.
	BARCHEWITZ.	T Chimie physique.
	BROSSEL.	T Physique atomique.
	BUSER.	Physiologie comparée.
	CAMUS.	Physiologie vég. (B.M.P.V.).
	CASTAING.	T Physique (Orsay).
	CURIEN.	T Minéralogie et Cristallographie.
	MOYSE.	T Physiologie végétale (Orsay).
	NOIROT.	Evolution des Etres org.
	PANNETIER.	T Chimie générale (Orsay).
	POSSOMPES.	T Zoologie.
	PULLMANN.	T Chimie théorique.

	TEILLAC.	T Physique nucl. et radio-activité.
	TONNELAT.	T Biologie physico-chimique.
	VILLE.	T Econométrie.
	WILLEMART.	Chimie (P.C.B.)
	DODE.	T Chimie (Orsay).
	FREYMANN.	T Recherches physiques.
	GUINOCHET.	T Biol. vég. S.P.C.N. (Orsay).
	ROLLET.	T Chimie (P.C.B.).
Mlle	JOSIEN.	T Chimie S.P.C.N.
MM.	CHEVALLEY.	T Géométrie algébrique et théorie des groupes.
	ARNOULT.	T Electronique (Orsay).
	CHAPELLE.	T Physique (Orsay).
	DELANGE.	T Mathématiques (Orsay).
	DENY.	T Mathématiques générales (Orsay).
	GERMAIN.	T Mécan. théor. des fluides.
	LUCAS G.	T Géologie.
	ALLARD.	T Chimie physique.
	BERTHELOT.	T Phys. fondamentale des hautes énergies (Orsay).
	BRICART.	T Météorologie et phys. de l'atmosphère.
Mme	ALBE-FESSARD.	Psychophysiologie.
MM.	FRIEDEL.	Physique des solides (Orsay).
	JULIA M.	Etudes des moléculaires naturelles complexes.
	LENDER.	T Biol. animale (S.P.C.N.) (Orsay).
	MAGAT.	Physico-chimie des radio-éléments.
Mlle	QUINTIN.	T Electrochimie.
MM.	MONOD.	T Chimie du métabolisme.
	BENOIT.	T Physiologie animale (Orsay).
	DE POSSEL.	T Analyse numérique.
	CHARLOT.	T Chimie analytique.
	HAISSINSKY.	T Radiochimie.
	LEMÉE.	T Physiol. vég. (B.M.P.V.) (Orsay).
	GUÉRIN.	T Chimie M.P.C. (Orsay).
	CHATELET M.	Chimie (P.C.B.).
	JEAN.	T Physique nucléaire (Orsay).
	MATTLER.	T Physique S.P.C.N. (Orsay).
	MICHEL L.	Phys. théor. des Hautes Energies (Orsay).
	BERGERARD.	Zoologie (Orsay).
	BERTEIN.	Electronique (Orsay).
	BOUISSIÈRES.	Chimie des Radioéléments (Orsay).
Mme	COUTURE.	Thermodynamique et Méc. physique.
MM.	ELLENBERGER.	Géologie appliquée sur le terrain.
	FRANC.	Biologie animale (P.C.B.).
	SCHNELL.	Botanique tropicale (Orsay).
	STOLKOWSKI.	Physiologie générale.
	ACHER.	Chimie biologique (Orsay).
	BAUDOUIN.	Biologie animale (P.C.B.).
	BEAUMONT.	Biologie animale (S.P.C.N.).
	BLAMONT.	Géophysique ionosphère.
	BOURREAU.	Botanique.
	CURIE D.	Physique (M.G.P.).
	DURAND-DELGA	Géologie.
	FREON.	T Chimie organique (Orsay).
	HELLER.	Physiologie végétale.
	TORTRAT.	Calcul des Probabilités.
	CAILLEUX.	Géologie (S.P.C.N.).
	MAGNAN.	T Physique (S.P.C.N.).
	DAUDEL.	T Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire.
Mlle	FOURCROY.	Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mme	CHOQUET-BRUHAT.	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.
Mlle	VEIL.	Physiologie générale.
MM.	LWOFF.	T Microbiologie.
	STESTRUNCK.	T Mécanique phys. et expérim.
	LACOMBE.	T Métallurgie des métaux nucléaires.
	BROCHARD.	T Physique (P.C.B.) (Orsay).
	CABANNES.	T Mécanique générale.
	LESIEUR.	T Mathématiques (M.P.C.) (Orsay).
	MAZET.	T Mécanique générale (Orsay).
	CAIRE.	Géographie physique et Géologie dynamique.
	COMOLET.	Mécanique des fluides.
	CORABŒUF.	Physiologie animale.
	DELLOUE.	Physique de l'exosphère.
	GORENFLOT.	Botanique II (Orsay).
	HOUILLON.	Biologie animale (P.C.B.).
	JULLIEN J.	Chimie (P.C.B.).
	MALGRANGE.	Techique mathématique de la Phys.
	OLIVIER.	Anthropologie.
	NOZERAN.	T Botanique II (Orsay).
	BLANC-LAPIERRE.	Physique (E.N.S.) (Orsay).

Secrétaire général

R. POULLAIN.

A Monsieur Georges RIZET

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538121_0003

AVANT - PROPOS

Ces recherches ont été effectuées sous la direction de M. le Professeur G. RIZET, au Laboratoire de Génétique de l'Institut de Biologie Physico-chimique et au Laboratoire de Génétique Physiologique du C.N.R.S., dirigés par M. le Professeur EPHRUSSI.

Je suis heureuse d'exprimer ici ma vive reconnaissance à M. le Professeur B. EPHRUSSI qui m'a accueillie dans son Service et n'a cessé de me témoigner sa confiance et de m'encourager, et à M. le Professeur Ph. L'HERITIER qui s'est toujours intéressé avec bienveillance à mon travail et m'a aidée de ses conseils et de ses critiques, pour la rédaction de ce mémoire.

Mes recherches ont bénéficié d'un climat scientifique particulièrement favorable. En effet, dans les Laboratoires de MM. EPHRUSSI, L'HERITIER, RIZET, de nombreux travailleurs s'intéressaient aux problèmes de l'hérédité cytoplasmique et cette conjonction facilitait de fructueux échanges. Le séjour de savants étrangers, des séminaires, conférences et un Colloque International (Gif, 1958), m'ont permis de suivre de près l'évolution de ces problèmes.

MM. les Professeurs J. CHEVAUGEON et P. SLONIMSKI, Melle D. MARCOU et M.J. BERNET, par l'intérêt amical avec lequel ils ont suivi le détail de mes expériences et leurs suggestions au cours de fréquentes discussions, m'ont apporté une aide précieuse ; M. le Professeur D.M. BONNER m'a initiée aux techniques de microchirurgie ; qu'ils soient assurés de ma gratitude, ainsi que tous ceux dont la présence et l'amitié ont facilité mon travail et en particulier Melle J. BOUCLIER et Mme M. ROSSIGNOL qui m'ont apporté leur collaboration dévouée.

En dédiant à M. G. RIZET ce travail dont il a été l'initiateur et le guide, j'espère lui exprimer mon affection et ma profonde reconnaissance pour l'intérêt inlassable qu'il a porté, chaque jour, à mes expériences et à la discussion de leurs résultats. Je lui dois aussi de m'avoir communiqué son enthousiasme pour la Recherche et pour la Biologie.

S O M M A I R E

INTRODUCTION — PAGE 1

CHAPITRE I : MATERIEL ET TECHNIQUES — " 6
- I - L'organisme étudié : Podospora anserina — " 6
- II - Techniques — " 12

CHAPITRE II : ANALYSE DU PHENOMENE DE BARRAGE — " 18
- I - Divers aspects des barrages chez le P. anserina — " 19
- II - Le barrage : phénomène d'incompatibilité cellulaire — " 21

CHAPITRE III : LE FACTEUR CYTOPLASMIQUE s — " 29

1 - LA TRANSFORMATION $s \xrightarrow{S} s$ — " 29
- I - Les modalités de la réversion d'une souche s^S — " 30
- II - Le déterminisme de la réversion — " 40
- III - Conclusions — " 48

2 - LA TRANSFORMATION $s \rightarrow s^S$ — " 49
- I - Recherches de discontinuités dans les propriétés des souches s — " 49
- II - Analyse des croisements S x s — " 54
- III - Conclusions — " 58

3 - CONCLUSIONS — " 59

CHAPITRE IV : LE FACTEUR CYTOPLASMIQUE S — " 61
- I - Action des souches S sur les souches s — " 61
- II - Action des souches S sur les souches s^S — " 69
- III - Analyse génétique et physiologique des souches SR et SNR — " 73
- IV - Conclusions — " 74

CHAPITRE V : INTERACTION DES FACTEURS CYTOPLASMIQUES S et s — " 77
- I - Influence d'une différence quantitative entre les deux facteurs sur le résultat de leur interaction — " 79
- II - Influence d'une différence physiologique entre les cellules confrontées — " 82
- III - Conclusions — " 86

DISCUSSION ET CONCLUSIONS — " 88
- I - Nature des facteurs s et S — " 90
- II - Mécanisme d'entretien des états s et s^S — " 94
- III - Les transformations $s \rightleftarrows s^S$, phénomène d'hérédité cytoplasmique — " 100
- IV - Barrage et incompatibilité cellulaire — " 105

RESUME — " 111

BIBLIOGRAPHIE — " 115

I N T R O D U C T I O N

Il n'est pas douteux que le cytoplasme joue un rôle important dans les phénomènes de différenciation cellulaire et dans l'hérédité. Le problème de son rôle génétique peut être abordé par l'étude des caractères à hérédité dite cytoplasmique. De tels caractères, mis en évidence chez des organismes divers : Protozoaires, Champignons, Arthropodes, se maintiennent sous leur forme normale ou sous leur forme mutante par hérédité cellulaire et se transmettent, dans les croisements, par hérédité maternelle. En analysant le déterminisme de ces caractères, on peut espérer préciser les mécanismes par lesquels le cytoplasme contribue au maintien et à la diversification des caractères héréditaires.

Les microorganismes constituent un matériel favorable à ce genre d'étude : leur multiplication végétative aisée permet d'analyser les conditions de maintien ou de modification du caractère étudié, tandis que leur sexualité permet l'analyse génétique des différences entre lignées normale et mutante ; de plus, les anastomoses entre filaments ou les conjugaisons entre cellules offrent la possibilité d'étudier le résultat d'échanges nucléaires et cytoplasmiques entre lignées différentes.

Nous avons étudié un cas d'hérédité cytoplasmique découvert chez le Champignon Ascomycète Podospora anserina, à la suite de l'étude du phénomène

de barrage entre souches S et s (RIZET, 1952).

Le terme de barrage désigne un type particulier d'antagonisme de croissance qui se manifeste lorsque deux thalles se rencontrent. La ligne de contact présente un aspect anormal, caractérisé par un bourrelet mycélien au centre d'une bande dépourvue de pigment. Ce phénomène traduit toujours une différence génétique entre les souches ; cette différence peut n'impliquer qu'un seul couple de gènes, comme c'est le cas pour le barrage entre les souches ne différant que par les gènes allèles S et s.

L'étude génétique des croisements S x s montra que, dans la F_1, toutes les souches de génotype s présentaient un phénotype différent de celui du parent s : elles ne faisaient barrage ni avec S ni avec s. Ces souches d'un type nouveau ont été appelées s^S. Leurs propriétés peuvent se résumer de la manière suivante :

1°) Le phénotype s^S est stable par multiplication végétative et les croisements s^S x s^S donnent une descendance homogène s^S.

2°) Les croisements S x s^S donnent les mêmes tétrades que les croisements S x s : 2S + 2s^S.

3°) Les croisements s x s^S donnent une descendance homogène de phénotype s ou s^S, selon le parent ♀.

4°) Les souches s^S peuvent toutes, avec une probabilité faible mais constante, réverser vers le phénotype s, identique à celui de la souche parentale.

5°) Cette réversion peut être provoquée régulièrement en confrontant une souche s^S avec une souche s ; dans ce cas, la réversion débute dans la zone de contact, lieu d'anastomoses entre les deux thalles.

6°) Qu'elle soit provoquée ou spontanée, la réversion, dès qu'elle

a débuté en un point, s'étend progressivement à toute la culture s^S.

Ces faits ont permis de conclure que :

- les souches s et s^S ont le même génotype s ;
- la transformation $s \rightarrow s^S$, régulièrement provoquée au cours des croisements S x s, résulte d'une modification cytoplasmique héréditaire, mais réversible ;
- le phénotype s est contagieux pour une souche s^S (RIZET, 1952).

Les particularités de cette modification héréditaire permettent de la rapprocher de divers autres phénomènes. Le caractère réversible de la transformation $s \rightarrow s^S$ et le pouvoir infectant d'un état cytoplasmique pour l'autre rappellent, mutatis mutandis, les propriétés des types antigéniques de la Paramécie (SONNEBORN et LE SUER, 1948 ; BEALE, 1952) ; chez le Podospora anserina, la sénescence (RIZET, 1953) constitue un autre exemple de modification cytoplasmique infectante (cf. RIZET, MARCOU et SCHECROUN, 1958 ; MARCOU, 1962) ; plus récemment divers cas de modifications cytoplasmiques infectantes et réversibles ont été décrites chez d'autres champignons : Aspergillus glaucus (SHARPE, 1958), Pestalozzia annulata (CHEVAUGEON et LEFORT, 1960), Curvularia pallescens (CUZIN, 1961).

D'autre part, le phénomène étudié chez le maïs par BRINK (1956) où le phénotype R^r est régulièrement transformé en R', dans l'hétérozygote R^r/R^{st}, rappelle tout-à-fait la transformation régulière du phénotype s en s^S au cours des croisements S x s.

Même si elles ne sont que formelles, ces analogies accroissent l'intérêt des problèmes génétiques et physiologiques posés par le phénomène de barrage entre souches S et s ; quelle est la nature des déterminants cytoplasmiques en jeu ? Par quel mécanisme ces déterminants se maintiennent-ils au

cours des multiplications cellulaires ? Quelles relations existent entre ces déterminants et le génotype ? Comment s'opère la transformation d'un état cytoplasmique en un nouvel état ?

Pour aborder ces problèmes, nous disposions de conditions favorables. D'une part les particularités biologiques du Podospora offraient de nombreuses possibilités pour l'étude expérimentale des conditions de maintien ou de transformation des phénotypes s et s^S ; d'autre part la relation entre la modification cytoplasmique et le couple de gènes S - s permettait l'analyse du rapport entre les déterminants cytoplasmiques et nucléaires. Aussi avons-nous pu apporter une réponse, au moins partielle, aux questions posées plus haut.

L'exposé de nos résultats sera conduit de la manière suivante :

Après une description de l'organisme et des techniques expérimentales (Chapitre I), le Chapitre II sera consacré à l'analyse du phénomène de barrage : nous verrons que le barrage est la traduction macroscopique de réactions d'incompatibilité cellulaire. Puis, l'étude des conditions de la transformation $s^S \rightarrow s$ et de celles de la transformation $s \rightarrow s^S$ (Chapitre III) nous permettra de définir un facteur cytoplasmique s, qui est responsable de l'incompatibilité et dont la présence conditionne le phénotype s, l'absence le phénotype s^S. En étudiant le mode d'action du gène S sur la transformation $s \rightarrow s^S$, nous reconnaîtrons l'existence d'un facteur cytoplasmique d'incompatibilité S et nous analyserons quelques propriétés des souches S (Chapitre IV). Enfin, l'étude de l'interaction des facteurs cytoplasmiques S et s dans différentes conditions (Chapitre V) nous permettra de préciser les propriétés de ces facteurs et d'établir leur relation avec les gènes auxquels ils sont associés. Au cours de la discussion de nos résultats, nous verrons que les facteurs cytoplasmiques

S et s, responsables de l'incompatibilité, ne peuvent être considérés comme des particules autoreproductibles et peuvent être reliés à l'activité des gènes S et s. Nous serons conduits à interpréter l'apparition et le maintien des phénotypes s et s^S comme la conséquence des propriétés particulières du gène s et de l'interaction entre ce gène et le facteur cytoplasmique s. L'intérêt de cette interprétation en termes d'interactions nucléocytoplasmiques sera envisagée sans le cadre des phénomènes d'hérédité cytoplasmique et d'incompatibilité cellulaire.

C H A P I T R E I

M A T E R I E L E T T E C H N I Q U E

I. L'ORGANISME ETUDIE : L'ASCOMYCETE PODOSPORA ANSERINA REHM

Podospora anserina (Syn. : Pleurage anserina (Ces.) Kuntze) est un Champignon Ascomycète appartenant au groupe des Pyrénomycètes. Ce Champignon a déjà fait l'objet de diverses études biologiques et génétiques (en particulier : AMES, 1934 ; RIZET, 1943 ; RIZET et ENGELMANN, 1949 ; BERNET, ESSER, MARCOU et SCHECROUN, 1960 ; MARCOU, 1962) ; aussi ne décrirons-nous ici en détail que les caractères de cet organisme dont la connaissance est nécessaire pour l'exposé qui va suivre.

A - CROISSANCE ET DEVELOPPEMENT.

Le mycélium du P. anserina est constitué par des filaments grêles (2-4 µ de diamètre) dont l'allongement se fait suivant le mode monopodique. Des cloisons perforées partagent les hyphes en "articles" de taille variable : les articles apicaux, qui assurent seuls l'allongement des hyphes, sont très longs (100-150 µ) tandis que les articles plus âgés ont de 15 à 50 µ. L'article constitue l'unité anatomique du thalle ; il contient de 5 à 10 noyaux.

En arrière de l'extrêmité en croissance, des rameaux se développent et de nombreuses anastomoses s'établissent entre hyphes voisines, faisant du

thalle un réseau dont une partie est rampante ou immergée dans le substrat et l'autre partie aérienne (Planche 1, 1).

Tout fragment de mycélium ensemencé sur un milieu gélosé (moût de maïs par exemple) donne naissance à une culture qui s'accroît radialement de 7 à 8 mm par jour à 28° C. Les jeunes thalles sont d'abord incolores, mais, vers le 3ème jour, une pigmentation verte ou brun-vert se développe à partir du centre ; quand toute la surface du milieu de culture est envahie, l'extension radiale cesse, la pigmentation s'intensifie et, si la culture est exposée à la lumière, il s'y différencie des organes sexuels mâles portant des microconidies uninucléées et des organes femelles (protopérithèces).

Le long d'une conidiophore, les microconidies sont formées une à une sur de petits pédoncules latéraux ou terminaux ; elles restent agglutinées en bouquets au niveau de chaque article (Planche 1, 2) mais se mettent immédiatement en suspension dans un liquide. Le protopérithèce abrite l'ascogone, différencié à l'intérieur d'un enroulement d'hyphes qui formeront l'enveloppe du périthèce et d'où émergent de nombreux trichogynes, récepteurs de microconidies (Planche 1, 3).

La fécondation exige toujours l'arrivée d'une microconidie dans un protopérithèce. Deux noyaux seulement paraissent être à l'origine de chaque périthèce, l'un apporté par la microconidie, l'autre par l'ascogone (RIZET, 1943). Après une multiplication de ces noyaux haploïdes, des cellules binucléées, qui deviendront les jeunes asques, s'isolent à l'extrêmité des hyphes ascogènes. Le couple de noyaux y fusionne et le noyau diploïde qui résulte de cette caryogamie subit immédiatement la méiose.

B - STRUCTURE DE LA TETRADE.

Dans chaque périthèce, on trouve une centaine d'asques à 4 ascospores binucléées, dont chacune donne généralement naissance à une culture autofertile (AMES, 1934 ; RIZET, 1943). L'ascospore, en effet, contient presque toujours un noyau + et un noyau -. Cette particularité résulte de la disposition des fuseaux à la méiose et de la post-réduction presque constante (98 %) du couple de gènes +/- (RIZET et ENGELMANN, 1949). Les noyaux de l'asque sont haploïdes et les souches issues de ces spores binucléées sont dicaryotiques.

Des souches monocaryotiques peuvent cependant être isolées ; en effet, dans 0,5 % des asques environ, l'une des quatre spores se trouve remplacée par deux petites spores uninucléées. Ce sont les souches monocaryotiques, + ou -, issues de ces spores, que nous utilisons couramment, en particulier pour réaliser des croisements. L'isolement de ces souches nécessite la recherche préalable des "asques à 5 spores" (Planche 1, 4).

C - QUELQUES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES SOUCHES.

Les souches homocaryotique + ou - sont autostériles, mais possèdent, comme les souches dicaryotiques, des organes ♂ et ♀ ; elles sont capables de fécondation croisée avec une souche de signe opposé, les microconidies de la souche + fécondant les protopérithèces de la souche - et réciproquement ; le croisement est possible soit en réunissant deux thalles, + et -, dans une même culture (confrontation), soit en déposant sur l'un d'eux une suspension de microconidies de l'autre (spermatisation).

Dans un croisement, la ségrégation pour chaque couple de caractères

mendéliens aboutit à deux types d'asques (Fig.1) en proportion variable

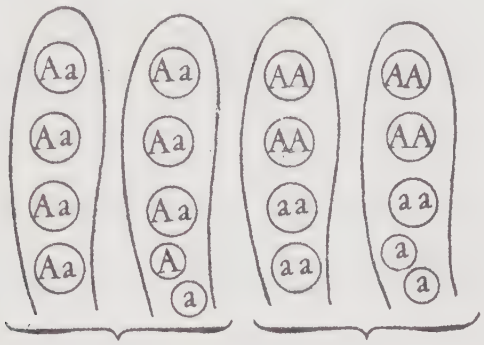


FIGURE 1

Schéma de la composition nucléaire des ascospores, dans les asques à 4 ou 5 spores, selon que le couple de gènes considéré (A/a) est pré- ou post-réduit.

suivant la fréquence de post-réduction du couple de gènes considéré. Dans les asques du type I, les spores binucléées sont hétérocaryotiques. Dans les souches qui en dérivent, l'état hétérocaryotique peut être stable et comme les deux noyaux sont de signes différents, la souche est autofertile sur toute la surface de culture ; toutefois l'équilibre entre les deux types nucléaires d'un hétérocaryote peut être instable et aboutir soit à leur ségrégation sectoriale, soit à l'élimination de l'un d'eux ; ces phénomènes sont rendus visibles par la distribution des fructifications sur la culture. D'autre part, le phénotype de la souche hétérocaryotique renseigne sur les rapports de dominance entre les allèles portés par chacun des noyaux.

Le Podospora se prête donc à des études génétiques aussi bien par ses souches dicaryotiques que par ses souches monocaryotiques.

Signalons une autre particularité biologique de l'espèce, qui

intervient au moment de la confrontation de deux souches. Une confrontation conduit soit à un contact normal soit à un barrage (Planche 1, 5) ; chez le Podospora tous les barrages observés correspondent à des différences génétiques entre les souches confrontées. Mais quel que soit le type de contact, la ligne de contact délimite nettement les deux thalles et il n'y a ni mélange des souches confrontées, ni passage de noyaux d'une souche à l'autre.

Cette propriété du Podospora se révèle très utile pour l'expérimentation.

D - LES DIFFERENTES SOUCHES UTILISEES.

Les particularités de la formation des asques ont pour résultat de donner au P. anserina sauvage la structure d'une espèce à reproduction uniparentale. Toute souche isolée à partir d'une fructification prélevée dans la nature est pratiquement homozygote pour tous les caractères à l'exclusion du signe. Chaque isolement permet donc d'obtenir des lignées isogéniques immédiatement utilisables (BERNET, ESSER, MARCOU, SCHECROUN, 1960).

1 - Les races géographiques.

Les souches isolées dans diverses régions de France et les quelques souches provenant des Etats-Unis présentent les mêmes caractéristiques générales qui définissent la forme "sauvage" du P. anserina précédemment décrite. Mais toutes ces souches sont génétiquement différentes : en particulier elles ont des longévités variées et la confrontation de deux quelconques d'entre elles conduit à la formation d'un barrage (loc. cit.).

Nous entretenons une douzaine de ces "races géographiques", dénommées A, B, C, D, E, F, G, H, K, M, N ; l'interstérilité qui accompagne fréquemment

le barrage (Cf. Chapitre II) rend difficile l'analyse génétique des différences entre ces souches, mais pour certaines d'entre elles, cette analyse a pu être faite, du moins en ce qui concerne les caractères de barrage (RIZET, 1953 ; ESSER, 1954 ; BERNET, non publié).

2 - Les mutants morphologiques.

Un certain nombre de mutants se distinguent de la forme sauvage par des caractères très aisément repérables du mycélium ou des spores. Il s'agit de mutations monogéniques qui nous servent à "marquer" les noyaux dans différentes expériences. Nous avons utilisé comme marqueur, en particulier : le gène I, qui inhibe la formation du pigment et des organes ♀ et qui est dominant dans l'hétérocaryote I + i ; le gène f, dont la présence conditionne un mycélium rampant à croissance légèrement plus rapide que celle d'une souche sauvage ; le gène p, qui provoque une réduction de la taille des spores ; le gène b, qui se manifeste par des colonies naines. Le signe servira également de marqueur nucléaire dans certaines expériences.

3 - Les souches S, s et s^S.

La définition des souches S et s remonte à l'apparition, au sein des lignées du groupe originel, d'un mutant faisant barrage avec les autres souches du groupe. Les lignées S et s initiales ont été entretenues indépendamment depuis lors et présentent sans doute aujourd'hui d'autres différences génétiques ; mais le caractère S ou s des souches actuelles n'est décelable que par la présence ou l'absence d'un barrage dans une confrontation avec une souche S ou s de référence. Les souches s^S, issues d'un croisement S x s, ne font barrage avec aucun des deux parents ; c'est également le seul caractère

qui les distingue des souches parentales. Le tableau I résume les relations entre souches S, s et s^S.

TABLEAU I

Définition des caractères S, s et s^S.
(/: contact normal ; //: barrage.)

Souche	S	s	s^S
S	/	//	/
s	//	/	/
s^S	/	/	/

Dans nos expériences, où nous aurons souvent à déterminer le phénotype s ou s^S d'une culture, cette détermination s'effectuera simplement en confrontant la souche à tester avec une souche S.

Les souches S, s et s^S seront utilisées soit sous leur forme sauvage, soit sous une forme mutante, obtenue par l'adjonction d'un marqueur morphologique qui ne modifie pas la nature des contacts.

II. TECHNIQUES

Nous avons utilisé au cours de ce travail, d'une part des techniques de culture, de sous-clonage, de croisement, couramment employées pour l'étude des Champignons - ou des variantes de ces techniques -, d'autre part la technique microchirurgicale qui permet d'expérimenter à l'échelle cellulaire.

A - MILIEUX DE CULTURE.

Les souches sont généralement cultivées sur des milieux naturels : moût de maïs (liquide ou gélosé à 20°/oo) ou crottin de cheval stérilisé, sur lesquels le Podospora accomplit tout son cycle. Sur ces milieux, les caractères de pigmentation, de croissance, de morphologie du mycélium, de barrage, qui distinguent les différentes souches utilisées sont parfaitement visibles.

Nous utilisons aussi parfois un milieu à l'extrait de levure (Yeast extract Difco : 5 g ; glucose : 2 g ; Bacto-agar Difco : 20 g ; H_2O distillée: q.s.p. 1000 cc) sur lequel la croissance et le phénotype des différentes souches sont comparables à ceux obtenus sur moût de maïs.

Nous avons également utilisé le milieu suivant : Yeast Extract Difco: 2 g ; Sorbose : 2 g ; Glucose : 1 g ; Bacto-agar Difco : 20 g ; H_2O : q.s.p. 1000 cc. En présence de sorbose, la croissance procède par courtes vagues successives et, sur le front de chacune d'elles, une énorme quantité de microconidies se forme. Ces microconidies ont une plus grande variabilité de taille (1-4 µ) que les microconidies formées sur les autres milieux (1-2 µ) et certaines d'entre elles sont capables de germer (cf. Chapitre III, p. 52).

Pour l'obtention de nouvelles souches, les ascospores sont semées individuellement sur crottin de cheval, où elles germent pratiquement toutes. Mais comme ce milieu opaque ne permet pas l'observation des stades précoces de la germination, on utilise aussi une nouvelle technique qui permet d'obtenir un fort pourcentage de germination (90 %) sur d'autres milieux (maïs gélosé, par exemple). On traite les paquets d'asques, prélevés dans les périthèces, pendant 1 h à 40° C, dans quelques cc de "jus de crottin" dilué (ce jus est extrait en pressant du crottin imbibé d'eau) ; les paquets d'asques ainsi

"prégermés" sont ensuite retirés et les spores individuelles, semées sur le milieu choisi, germent dans l'heure qui suit.

Nous ne connaissons pas de milieu synthétique qui assure à la fois la croissance normale et la fructification de P. anserina. Aussi n'avons nous qu'occasionnellement utilisé ces milieux : milieu de WESTERGAARD et MITCHELL (1947) ou milieu de TAVLITZKI (1954) : KH_2PO_4 : 1 g ; $Mg\ SO_4\ ,\ 7H_2O$: 0,5 g ; NaCl : 0,1 g ; $CaCl_2$ anh. : 0,1 g ; $(NH_4)^2\ SO_4$: 13,3 g ; $Mn\ SO_4,\ 4H_2O$: 0,002 g ; Glucose : 20 g ; Bacto-agar Difco : 20 g ; H_2O q.s.p. 1000 cc, tamponné à pH 6.

B - TECHNIQUES DE CULTURE.

1 - Propagation d'une souche.

Le Podospora n'a pas comme le N. Crassa par exemple, de conidies assurant une reproduction asexuelle et, normalement, ses microconidies ne germent pas. Aussi le seul moyen de multiplier une souche est-il de repiquer des fragments de mycélium ; ce sont habituellement des "semis" de quelques millimètres carrés, découpés dans une culture sur milieu gélosé.

Mais un certain nombre de techniques permettent de réduire considérablement la taille des semis.

a) On peut isoler, sous la loupe binoculaire, des semis ne comprenant que quelques hyphes ou même un seul fragment d'hyphe. L'utilisation d'un "mixer" permet d'obtenir, en grand nombre, ces très petits fragments ; un semis d'un cm^2 par exemple, broyé pendant 3' dans 20 cc de milieu nutritif liquide, donne une suspension relativement homogène de fragments d'hyphes, qui peut être manipulée comme une suspension d'organismes unicellulaires.

Cette technique permet, en particulier, d'étudier la composition nucléaire d'une souche hétérocaryotique ; par broyage d'un hétérocaryote $S + s^S$ par exemple, on obtient des cultures monocaryotiques, S ou s^S, ainsi que des cultures qui sont encore hétérocaryotiques, la proportion des trois types variant avec le degré de broyage.

b) On peut aussi séparer, à l'aide du micromanipulateur, les articles d'un fragment d'hyphes.

c) On peut obtenir des éléments propagateurs de dimensions inférieures à celles d'un article. Des hyphes placées dans une solution de suc digestif d'Helix Pomatia, selon la technique de BACHMANN et BONNER (1959), libèrent de nombreux protoplastes de quelques μ (4-10) de diamètre ; transférés dans un milieu nutritif hypertonique (Glucose 0,6 M), une certaine proportion de ces protoplastes reconstituent des thalles normaux.

d) Enfin, la taille de l'élément propagateur a pu être réduite jusqu'à 1-4 μ, grâce à la capacité de germination de certaines des microconidies formées sur le milieu au sorbose.

2 - Réalisation des croisements.

a) par confrontation. On ensemence les deux souches parentales dans une boîte de Pétri, en plaçant les semis à quelques cms l'un de l'autre ; lorsque les deux thalles se sont rejoints et que leur extension a cessé, on expose la culture à la lumière et, en quelques jours, les périthèces se développent le long de la ligne de contact. Cette ligne de périthèces comprend évidemment les fructifications des deux croisements réciproques.

b) par spermatisation. La technique de spermatisation (MONNOT, 1953) permet d'obtenir séparément les deux croisements réciproques. Le parent

♀ est ensemencé en boîte de Pétri, le parent ♂ en tube ; après arrêt de la croissance et exposition des cultures à la lumière pendant quelques jours, on répand sur la souche ♀ une suspension de microconidies. Cette suspension est obtenue par agitation de la culture ♂ avec quelques cc de milieu liquide, puis filtration pour éliminer les fragments mycéliens ; quelques jours plus tard, des périthèces se développent simultanément sur toute la surface de la souche ♀ arrosée par la suspension.

C - TECHNIQUES MICROCHIRURGICALES.

Nous avons utilisé le micromanipulateur de DE FONBRUNE. Nous ne rappellerons pas ici les possibilités de cet instrument ni les détails des techniques d'utilisation qui sont parfaitement exposés ailleurs (DE FONBRUNE, 1949). Nous avons eu recours au micromanipulateur pour cultiver des hyphes individuelles, en isoler des articles, réaliser des anastomoses.

La culture d'hyphes isolées est faite de la manière suivante : des extrêmités apicales d'une centaine de µ sont prélevées sur de très jeunes cultures obtenues en milieu liquide, dans la chambre à huile ; chaque pointe d'hyphe est transportée dans une microgoutte de milieu où elle s'allonge. En réglant soigneusement la quantité de milieu avec une micropipette et en dirigeant la croissance à l'aide d'une micro-aiguille, on obtient un filament presque dépourvu de rameaux secondaires ; ceux qui se développent peuvent d'ailleurs être coupés ou ramenés contre le tronc principal avec lequel ils confluent. Surveillés et dirigés continuellement, les hyphes peuvent suivre le tracé voulu et atteindre la longueur souhaitée.

Le processus des anastomoses a été décrit en détail par BULLER (1933), mais on ne connaît pas le déterminisme exact du phénomène d'attraction

entre les hyphes. Pratiquement, pour réaliser une anastomoses entre deux filaments A et B, on rapproche à quelques 10 , l'hyphe A du point de B choisi pour le contact ; en diminuant la quantité de milieu, on sait hâter la formation de l'anastomose et on peut en déterminer le type (Fig.2, a, b ou c) d'après la disposition relative des 2 hyphes.

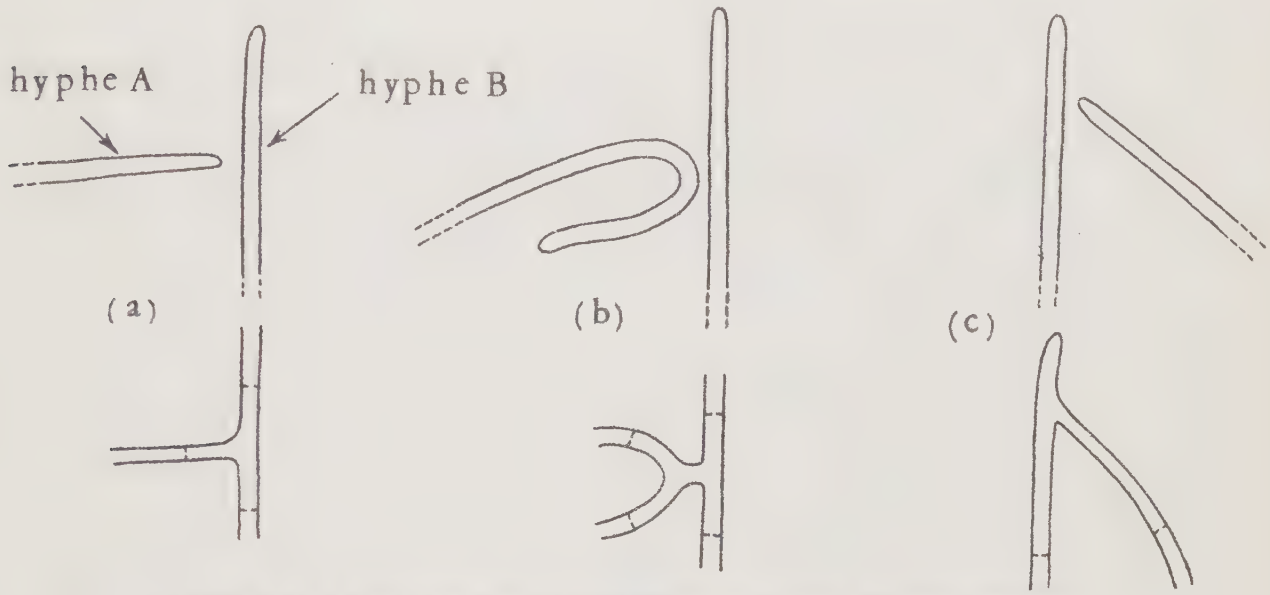


FIGURE 2 : **Réalisation de différents types d'anastomoses.**

L'isolement d'un article nécessite que les cloisons qui le délimitent soient fermées ; aussi faut-il, avant de sectionner l'hyphe, exercer une pression délicate de part et d'autre de l'article choisi ; ce stimulus déclanche l'obturation instantanée des cloisons.

Les hyphes et surtout les articles isolés ne résistent pas toujours aux diverses manipulations ; aussi est-il laborieux de mener à bien une expérience de plusieurs jours et le nombre de répétitions d'une expérience donnée est-il limité. Mais cet inconvénient se trouve en partie compensé par la précision des résultats obtenus.

C H A P I T R E I I

A N A L Y S E D U P H E N O M E N E D E B A R R A G E

Généralement, lorsque deux souches d'une même espèce de Champignon sont confrontées, elles s'interpénètrent plus ou moins profondément et de nombreuses anastomoses établissent une continuité entre les deux thalles. Mais il arrive que deux souches confrontées exercent l'une sur l'autre une répulsion ou une inhibition qui prévient ou raréfie la rencontre des hyphes. Cet antagonisme de croissance ou, d'après certains auteurs, cette "aversion mutuelle", offre des modalités diverses selon les espèces et répond à des déterminismes génétiques divers.

Le terme de barrage désigne certaines de ces confrontations anormales. Chez plusieurs Basidiomycètes tétrapolaires, un "barrage sexuel" (VANDENDRIES, 1932) s'observe entre souches monocaryotiques possédant en commun l'un des allèles de compatibilité sexuelle (cf. PAPAZIAN, 1950) : une ligne claire, pratiquement dépourvue de filaments, sépare les deux thalles. Chez le P. anserina, le déterminisme des barrages est indépendant de celui de l'hétérothallisme ; les mycéliums des souches antagonistes se rejoignent, mais leur morphologie est modifiée dans la zone de contact.

I. DIVERS ASPECTS DES BARRAGES CHEZ LE P. ANSERINA

Si l'on ne connaît qu'un cas de barrage entre deux lignées d'une même souche, le barrage est général entre deux "races géographiques" du P. anserina. Tous les barrages observés chez cet organisme ont le même aspect morphologique.

A - MORPHOLOGIE DU BARRAGE.

Sa première manifestation, visible moins de 24 h après la rencontre des souches, est la formation d'un bourrelet mycélien qui souligne la ligne de contact ; la physionomie définitive du barrage (Planche 1, 5) n'apparaît que deux à trois jours plus tard, lorsque la pigmentation s'est développée sur la culture. Une bande de quelques millimètres de large, à cheval sur la ligne de contact, demeure non pigmentée et dépourvue d'organes femelles ; au milieu de cette bande hyaline, le bourrelet mycélien apparaît rosâtre, à cause de la grande densité des microconidies qui s'y forment.

B - INFLUENCE DU BARRAGE SUR LES PHENOMENES SEXUELS.

Le barrage n'inhibe pas nécessairement les fécondations entre souches de signe contraire. Dans les confrontations fertiles, entre souches S et s par exemple, comme l'absence d'organes femelles sur la ligne de contact y empêche la formation de périthèces, les fructifications se développent de part et d'autre du bourrelet, en deux lignes parallèles (Planche 1, 6). Formée séparément sur chacune des deux souches, chaque ligne de périthèces représente l'un des deux croisements réciproques. Mais dans certains confrontations entre

souches d'origines géographiques différentes, on n'obtient de fructifications que sur l'une des deux souches ou même sur aucune ; il ne s'agit jamais de stérilité des organes sexuels : mais soit de semi-incompatibilité (ESSER, 1954 ; BERNET, non publié), soit d'incompatibilité réciproque.

Les anomalies ne vont pas toujours jusqu'à l'impossibilité de croisement. Entre certaines souches, on observe une fertilité atténuée ; il ne se forme qu'un nombre plus ou moins réduit de périthèces et la densité des fructifications obtenues est caractéristique du croisement considéré. La stérilité totale et la semi-incompatibilité ne sont que des cas particuliers d'une diminution de fertilité qui peut présenter tous les degrés et affecter de manière différente les deux croisements réciproques.

C - DETERMINISME GENETIQUE DES BARRAGES.

Nous avons vu qu'entre les souches S et s, le barrage n'est dû qu'à un seul couple de gènes. L'analyse génétique des barrages entre diverses races géographiques a permis d'identifier de nombreux autres couples de gènes de barrage. Une différence portant sur deux de ces gènes, allèles ou non allèles, suffit toujours à provoquer le barrage entre deux souches ; mais, entre races géographiques, le barrage résulte fréquemment de la superposition de plusieurs mécanismes indépendants ; les souches s et M par exemple, diffèrent par au moins trois couples de gènes de barrage, qui représentent trois déterminismes distincts, capables chacun de provoquer le barrage entre ces souches (RIZET, 1953 ; ESSER, 1954 ; BERNET, non publié).

Les mêmes gènes sont, dans certains cas, responsables des anomalies observées dans la fertilité (loc. cit.) et ils provoquent la formation de

descendants anormaux. Les souches dicaryotiques qui contiennent les deux types nucléaires parentaux ont une croissance anormale, jusqu'à ce que l'un des types de noyaux soit éliminé (ESSER, 1959) ; si les gènes de barrage parentaux ne sont pas allèles, leur réunion dans un même noyau donne une souche létale (loc. cit. ; BERNET, non publié).

II. LE BARRAGE : PHENOMENE D'INCOMPATIBILITE CELLULAIRE

Si le barrage est microsoopiquement très apparent, l'observation microscopique ne permet pas, à cause de la densité et de l'enchevêtrement des hyphes, de voir aisément ce qui différencie, à la rencontre des thalles, un barrage d'un contact normal.

A - MISE EN EVIDENCE DE LA REACTION D'INCOMPATIBILITE.

Aussi avons-nous observé, au plus fort grossissement du microscope, des contacts réalisés au micromanipulateur, entre hyphes isolées. Nous avons alors constaté que :

1°) Dans une confrontation normale, sans barrage, entre hyphes d'une même souche, ou entre hyphes s et s^S ou S et s^S, le contact est rapidement suivi d'anastomose. Le pont d'anastomose établit une continuité durable entre les protoplasmes des articles qui ont fusionné et permet des échanges entre les hyphes : on peut voir, au contraste de phase, des vacuoles et des granules passer doucement d'une hyphe à l'autre à travers le pont d'anastomose.

2°) Dans une confrontation avec barrage, les hyphes s'anastomosent, mais il se produit une réaction d'incompatibilité, consécutive à l'anastomose.

La planche II illustre le déroulement de la réaction d'incompatibilité. Lorsque les deux filaments antagonistes viennent en contact, ils s'anastomosent normalement (1 et 2) ; mais 15 à 20' (à 26°) après l'établissement du contact cytoplasmique, les articles qui ont fusionné sont le siège d'une réaction caractéristique ; des granulations agitées de mouvements de plus en plus intenses apparaissent, les cloisons limitrophes s'obturent, ainsi que le point d'anastomose (3). Des vacuoles rondes se forment et grossissent, le contenu des articles se désorganise, le cytoplasme se rétracte, la membrane devient molle et perd sa refringeance : les articles sont morts (4 et 5). Les articles contigus ne tardent pas à régénérer, à l'intérieur (6) ou à l'extérieur (7) des articles morts et, si les hyphes régénérées s'anastomosent à nouveau, le même processus recommence (8).

Cette réaction, qu'on observe chez le Podospora dans tous les barrages étudiés n'est pas particulière à l'espèce : un phénomène identique a été décrit chez le Neurospora crassa (GARNJOBST et WILSON, 1956) ; dans ce cas également, c'est une différence portant sur un couple de gènes qui détermine le barrage. Ces phénomènes ne sont peut être pas sans rapport avec les réactions d'histo-incompatibilité observées chez les animaux supérieurs et pour lesquelles on a également identifié des couples de gènes responsables de ces réactions.

B - INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS SUR LA REACTION D'INCOMPATIBILITE.

1 - Influence du génotype.

Suivant les souches, une certaine variabilité s'observe dans le détail de la réaction d'incompatibilité. Entre souches S et s par exemple, la réaction est tout à fait symétrique et n'intéresse, en général, que les deux articles

anastomosés. Mais si les deux souches antagonistes portent le gène f (cf. Chapitre I p. 11), le temps de réaction est nettement plus long et la mort survient sur deux ou trois articles de part et d'autre de l'anastomose. Quand le gène f n'est présent que dans l'une des deux souches, la réaction paraît dissymétrique : elle s'étend, dans l'hyphe f, sur une plus grande longueur que dans l'hyphe sauvage. De même, lorsque l'une des deux souches, S ou s, porte le gène I, le plus souvent, seul l'article I meurt.

2 - Influence de la température.

Le temps de réaction, défini par l'intervalle entre le contact cytoplasmique et l'apparition des premiers symptômes de réaction, passe de 20 - 30' à 10 - 15', lorsque la température augmente de 20 à 28° C. A 4° C, la réaction se produit normalement, en quelques heures.

3 - Influence de l'état physiologique des hyphes.

L'allure de la réaction varie considérablement avec l'état physiologique des hyphes. Dans des hyphes très jeunes, par exemple les gros filaments qui sortent des spores, ou des hyphes maintenues dans un milieu très riche (extrait de levure), tout le processus, mort et régénération, est accéléré ; la mort survient brutalement, comme si le cytoplasme coagulait tout d'un coup et la réaction est strictement limitée aux deux articles anastomosés. Au contraire, entre hyphes âgées, très vacuolisées, ou entre hyphes maintenues dans un milieu très pauvre (eau non distillée), la réaction apparaît plus lentement, et son aspect est très particulier : les vacuoles s'agrandissent jusqu'à ce que les cellules soient complètement vides ; cette réaction s'étend progressivement sur plusieurs articles ; souvent, on n'observe pas de régénération des articles non touchés.

On voit donc que d'une manière générale, lorsque la réaction est rapide, elle est peu étendue et réciproquement, et que la vitesse de réaction paraît dépendre de l'activité métabolique des cellules. Aussi avons-nous cherché à inhiber la réaction sous l'effet de produits tels que le chloramphenicol et la ribonucléase.

4 - Effet d'inhibiteurs des activités synthétiques.

Le chloramphenicol est réputé inactif sur les champignons à la dose de 1000 γ /cc. (BROCK, 1961). Si l'on met en contact des hyphes de souches incompatibles dans une solution saturée de chloramphenicol, on n'observe aucun effet sur la réaction d'incompatibilité. Mais nous avons obtenu un résultat très net dans les conditions suivantes : à partir d'hyphes déposées dans une micro-goutte d'une solution saturée de chloramphenicol, nous isolons des articles. Comme cet isolement nécessite une section de l'hyphe de part et d'autre des deux cloisons qui limitent l'article, il se peut que la solution ait quelque chance de pénétrer dans l'article au moment où les cloisons vont s'obturer, ou bien que ces cloisons soient, au début, plus minces et perméables que la membrane normale de l'hyphe. Quoiqu'il en soit, si l'on rapproche deux articles S et s isolés de cette manière, ils s'anastomosent rapidement, mais la croissance est très inhibée et si la réaction d'incompatibilité n'a pas lieu dans les délais normaux, elle ne se produit pas. On peut conserver ces articles mixtes compatibles en vie, dans le chloramphenicol, pendant environ 24 h. Si on les transporte ensuite dans le milieu nutritif, la compatibilité subsiste, même lorsque la croissance reprend. Mais généralement, la croissance ne reprend normalement qu'à partir de l'article s. Les cultures obtenues à partir des articles mixtes compatibles (par exemple : S+/s-) ont toutes le phénotype s-. On constate,

d'après la distribution des fructifications (rares et limitées au centre de la culture) et l'analyse par broyage de ces cultures, que les noyaux S ne se sont presque pas multipliés et n'ont pas tardé à être éliminés.

Le chloramphenicol paraît donc agir sur la souche S. Mais des articles S seuls, maintenus 24 h dans le chloramphenicol, puis transférés dans un milieu nutritif, repoussent normalement et les cultures obtenues ne sont en rien modifiées. Il en est de même pour des articles s seuls. Plus de trente articles S et trente articles s ont été ainsi testés. Si le chloramphenicol agit sur S, son effet ne se manifeste qu'en présence de s.

Des résultats en tous points identiques ont été obtenus avec la ribonucléase à 100 γ /cc. Au total, sur une cinquantaine d'articles mixtes (S/s) traités à la ribonucléase ou au chloramphenicol, plus de trente sont restés compatibles. Sur le même nombre d'articles mixtes témoins, maintenus dans l'eau, une demi-douzaine seulement sont restés compatibles. Les cultures obtenues à partir de chacun de ceux-ci manifestent également le phénotype s.

Dans le cas particulier d'une anastomose entre deux articles S et s, l'incompatibilité peut donc ne pas se manifester ; la probabilité d'obtenir ces articles mixtes compatibles est fortement accrue en présence de chloramphenicol et de ribonucléase. Nous reviendrons, dans le Chapitre V, sur la signification de ce problème.

C - LES AUTRES MANIFESTATIONS DU BARRAGE.

A l'échelle de la culture, le bourrelet représente l'accumulation des régénérations successives des hyphes ayant réagi. Mais si la réaction d'incompatibilité, aboutissant à la mort des cellules confrontées, est le fait le

plus caractéristique du barrage, elle n'en est pas la seule manifestation : que signifie la bande dépourvue de pigment qui s'étend de part et d'autre du bourrelet et ne correspond à aucune altération visible des filaments ?

Cetie absence de pigment caractérise toujours un mélange intime d'hyphes antagonistes. En effet, si l'on sème un mélange de spores S et s, la culture obtenue présente un aspect très particulier : on observe, autour du semis, un disque mycélien, de 1 ou 2 cm de diamètre dépourvu de pigment, d'où s'isolent des secteurs alternativement S et s, séparés par une ligne de barrage (Planche I, 7). La zone blanche centrale est constituée par un mélange d'hyphes de deux souches incompatibles, entre lesquels se font des anastomoses ; mais la fréquence des articles morts y est relativement faible.

L'observation suivante permet de comprendre ce fait inattendu.

On peut obtenir, en chambre à huile, plusieurs anastomoses très rapprochées entre deux hyphes, S et s par exemple, en les disposant côte à côte (Fig.3). Certains des articles mixtes meurent, mais, dans les autres, la

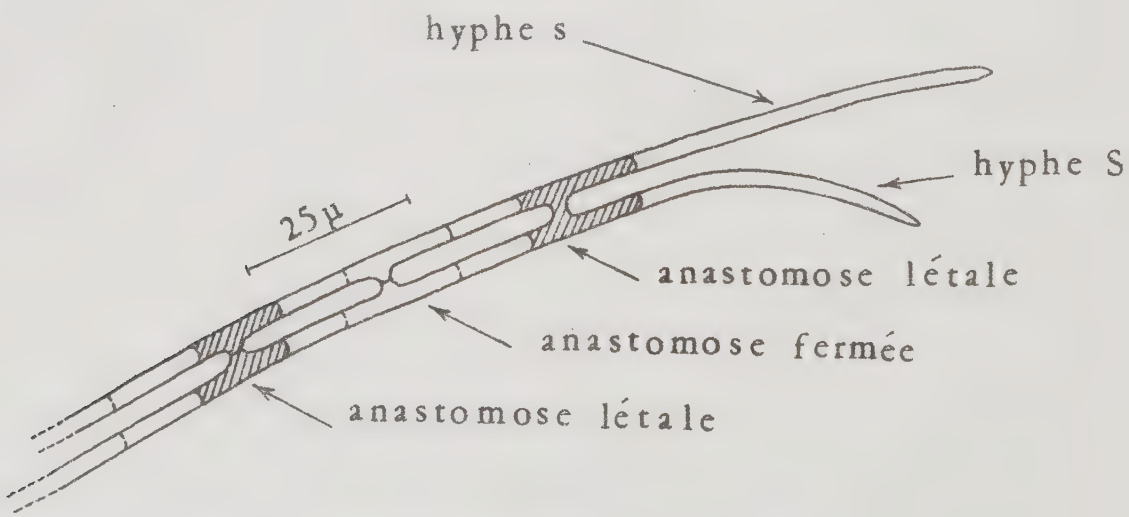


FIGURE 3 : Cas d'anastomoses S - s non létales.

réaction ne va pas jusqu'à son terme : après les premiers symptômes (agitation, fermeture des cloisons), tout rentre dans l'ordre, à ceci près que le pont d'anastomose reste définitivement fermé. Si l'on isole les articles restés vivants, on constate qu'ils ont conservé leur caractère S ou s. Il semble donc que les réactions voisines aient produit, dans ces hyphes, une modification physiologique ayant pour effet de hâter la fermeture des cloisons ; tout se passe comme si entre les deux articles, les échanges n'avaient pas été assez importants pour provoquer la mort. On peut donc supposer que, dans une culture mixte S x s, où les deux souches entremêlent leurs hyphes, les mêmes modifications physiologiques se trouvent plus ou moins généralisées, de sorte que beaucoup d'anastomoses se referment aussitôt formées. Ceci peut expliquer la relative rareté des articles morts dans ces cultures.

L'existence de modifications physiologiques, consécutives à l'anastomose et s'étendant assez loin au-delà de la zone de réaction, est confirmée par trois autres observations :

1°) Au moment de la réaction, l'allongement des rameaux voisins du point d'anastomose s'arrête ;

2°) des microconidies se forment sur les hyphes aux environs des points de réaction, dans des conditions ou les mêmes hyphes, n'ayant pas subi de contact de barrage, n'en produisent pas ;

3°) rappelons qu'il ne se différencie pas de protopérithèces sur la ligne de contact.

<u>En résumé</u>, le barrage traduit une réaction d'incompatibilité qui s'effectue en deux temps : un premier temps de contact et d'échanges par le canal des anastomoses qui s'établissent entre les hyphes antagonistes ; un

second temps de réaction qui a pour premier effet de couper le contact entre ces hyphes. Ce contact aboutit d'une part à la mort des articles mixtes, phénomène localisé au niveau des anastomoses, d'autre part à une modification physiologique plus étendue, qui se traduit par l'inhibition de la synthèse du pigment et de la formation des protopérithèces et par l'activation de la production des microconidies.

L'incompatibilité entre les souches S et s, comme dans divers autres cas analysés chez le Podospora ou le Neurospora (loc. cit.) est sous la dépendance d'un couple de gène ; mais par suite d'une modification cytoplasmique, une souche de génotype s perd durablement son incompatibilité avec une souche S. Au cours des chapitres suivants, nous essaierons de préciser le rôle respectif du noyau et du cytoplasme dans le déterminisme de cette incompatibilité.

CHAPITRE III

LE FACTEUR CYTOPLASMIQUE s

Comme nous l'avons vu dans l'Introduction, au même génotype s peuvent correspondre deux phénotypes s et s^S, qui sont l'expression de deux états cytoplasmiques héréditaires et mutuellement exclusifs. Nous allons essayer de préciser la nature de la différence entre ces états.

Deux voies d'approche nous sont offertes pour cette recherche ; l'étude de la transformation $s^S \rightarrow s$ et l'étude de la transformation inverse.

1 - LA TRANSFORMATION $s^S \rightarrow s$

Dans une culture s^S, la transformation $s \rightarrow s^S$ (réversion) peut se produire spontanément ou être déclanchée régulièrement au contact d'une culture s. Lorsque la réversion a débuté en un point, elle s'étend progressivement à toute la culture s^S : le phénotype s est "contagieux" pour une souche s^S (RIZET, 1952).

Nous avons cherché à analyser les modalités de ce phénomène d'infection et le déterminisme de son apparition.

I. LES MODALITES DE LA REVERSION D'UNE SOUCHE s^S

Avant d'essayer de comprendre comment se propage la réversion dans une culture s^S, il est nécessaire de savoir dans quelles conditions elle est régulièrement déclanchée par le contact avec une souche s.

A - LE DECLANCHEMENT DE LA REVERSION PROVOQUEE PAR LE CONTACT s/s^S.

Pour analyser avec précision le rôle de la souche s dans ce déclanchement, nous avons étudié des contacts entre hyphes isolées s et s^S, par la technique de micromanipulation (SCHECROUN, 1958).

1°) Principe des expériences

La figure 4 schématise le type d'expériences réalisées : on rapproche deux hyphes, s et s^S (4 a) ; le plus souvent ils s'anastomosent (4 c) mais il arrive aussi qu'ils se longent, s'accolent, se chevauchent, sans s'anastomoser (4 b). Si une anastomose se forme, elle établit, entre les hyphes, un contact protoplasmique ; en l'absence d'anastomose, ce contact ne se produit pas.

Dans l'un ou l'autre cas, on peut à tout moment séparer les filaments et les découper en fragments dont les positions respectives et les longueurs sont notées ; chaque fragment, composé de quelques articles, est isolé dans une microgoutte de milieu nutritif où il repousse. Les caractères des cultures issues de chacun des fragments peuvent être testés et en particulier leur phénotype s ou s^S. De plus, si l'on marque génétiquement les deux souches mises en contact, tout passage de noyaux d'une hyphe à l'autre peut être décelé.

Dans l'exemple représenté sur la figure 4, les souches mises en contact sont s/+/I et s^S/-/i ; s'il passait des noyaux d'une souche à l'autre,

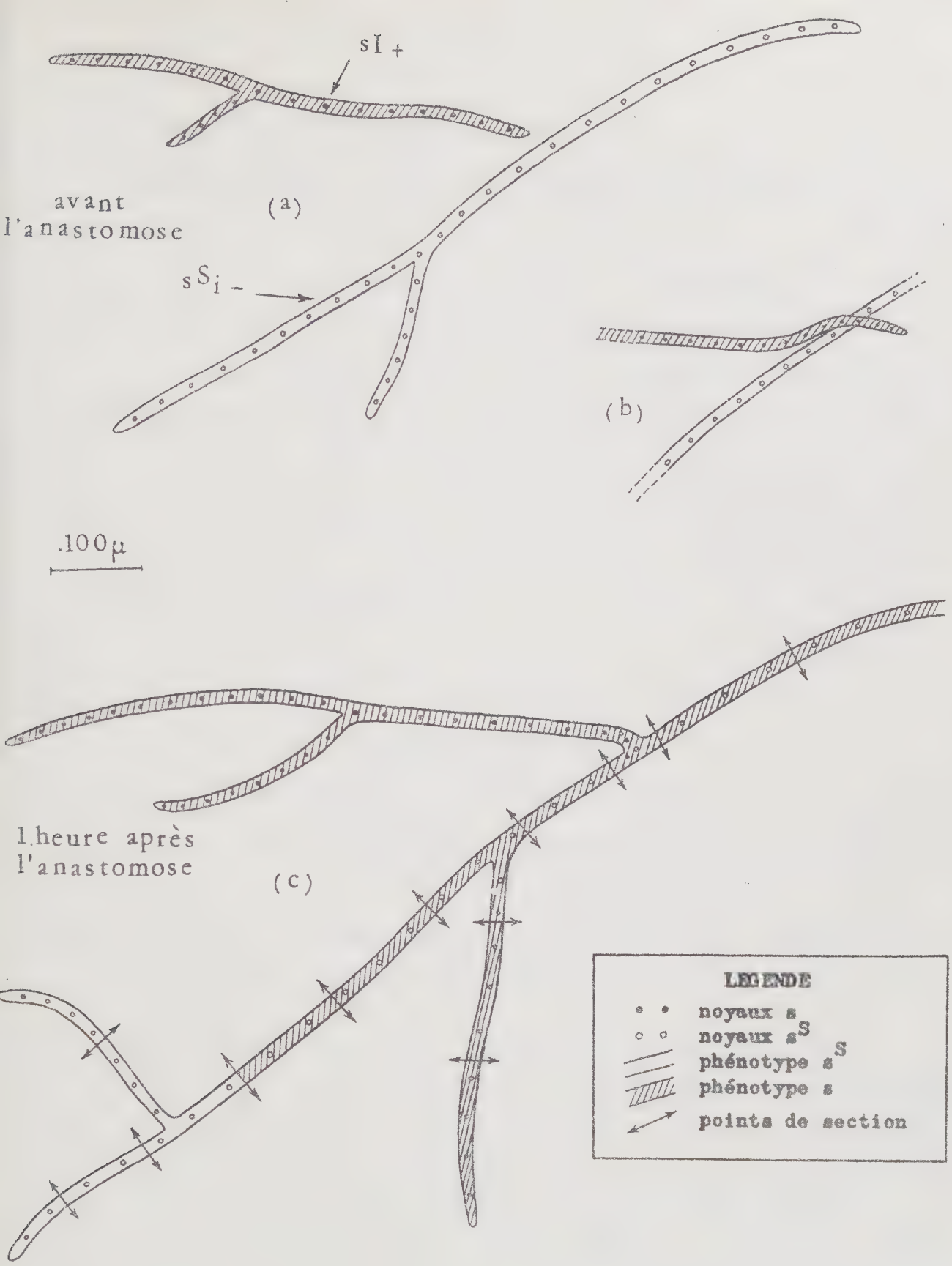


FIGURE 4 : Etude de la réversion provoquée par le contact s - s^S.

les fragments de l'hyphe s^S donneraient des mycéliums +/-, c'est-à-dire autofertiles et I/i, très reconnaissables grâce au caractère dominant du marqueur I.

2°) Résultats

Les résultats de ces expériences, répétées de nombreuses fois, en utilisant différentes souches s et s^S, sont les suivants :

- quand il n'y a pas eu d'anastomose avec le filament s, le filament s^S reste s^S, aussi intime et prolongé qu'ait été le contact.
- au contraire, toute anastomose déclanche la réversion ; celle-ci progresse dans l'hyphe à partir du point d'anastomose.
- l'anastomose peut être brève : elle reste efficace même si le contact est interrompu après 1/4 h.
- la réversion se propage de manière continue : on ne trouve jamais un fragment d'hyphe non réversé entre deux fragments réversés.
- la réversion s'étend à tout le thalle s^S, y compris les ramifications qui se sont développées pendant le temps de l'expérience, et même si l'on a, très tôt après l'anastomose, éliminé le filament s.
- cette propagation ne s'accompagne jamais de migration de noyaux de la souche inductrice et aucun noyau de la souche s^S ne se retrouve dans le filament s.

Le caractère s est donc transmis à une souche s^S par contact avec le protoplasme s, de la même manière que le caractère "Killer" est transmis à une Paramécie sensible par contact avec le protoplasme Killer (SONNEBORN, 1946). Chez le Podospora anserina, le caractère "sénescent" est, dans les mêmes conditions, transmissible à une hyphe "jeune" (MARCOU et SCHECROUN, 1959). Il aurait été intéressant de chercher à provoquer la transformation en injectant, dans

une hyphe s^S, du cytoplasme ou des extraits de cytoplasme s. Mais la petitesse des hyphes ne nous a pas permis de réussir de micro-injections, comme on a pu le faire chez le Neurospora crassa (WILSON, 1961).

Mais si l'on ne peut étudier la nature chimique de déterminant du phénotype s, d'autres propriétés de ce déterminant sont accessibles ; la structure du thalle permet en effet de suivre la propagation de phénotype contagieux dans la souche receveuse. Nous venons de voir que le phénotype s se propage de manière continue à l'intérieur des hyphes et qu'une seule anastomose, même brève, suffit à transformer une culture quelle que soit sa taille ; nous pouvons également mesurer la vitesse de propagation et rechercher des facteurs susceptibles de la modifier.

B - LA VITESSE DE PROPAGATION.

1°) Techniques de mesure

Les techniques utilisées consistent à mesurer, dans une culture en boîte de Pétri, le chemin parcouru par la transformation dans un intervalle de temps donné.

a) Première technique : deux souches s et s^S sont ensemencées dans une boîte de Pétri (Fig.5) de manière que leur contact se réalise au même moment sur quelques cms, le long desquels se font des anastomoses à peu près simultanées ; il s'établit alors un "front de réversion", qui s'éloigne de plus en plus de la ligne de contact et dont on détermine la position en prélevant des semis à intervalles réguliers ; le caractère s ou s^S des cultures issues de chacun de ces semis est testé. Les semis peuvent être prélevés le long des différentes directions et, en particulier, parallèlement ou tangentiellement aux rayons de croissance du thalle (Fig.5, a et b).

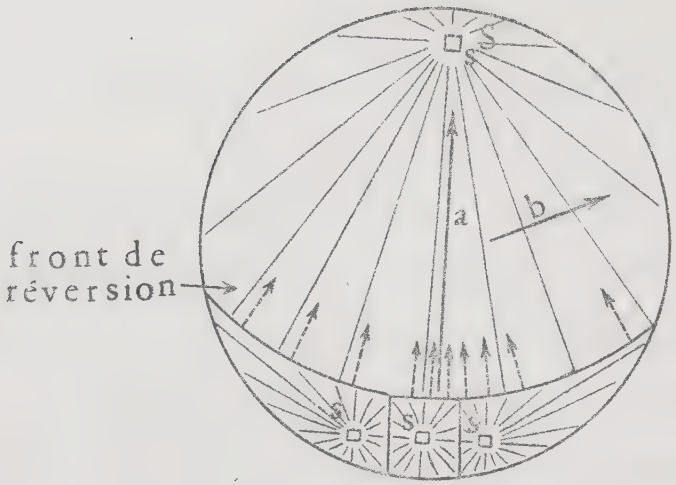


FIGURE 5

Mesure de la vitesse de propagation de la réversion (1ère technique). Explications dans le texte.

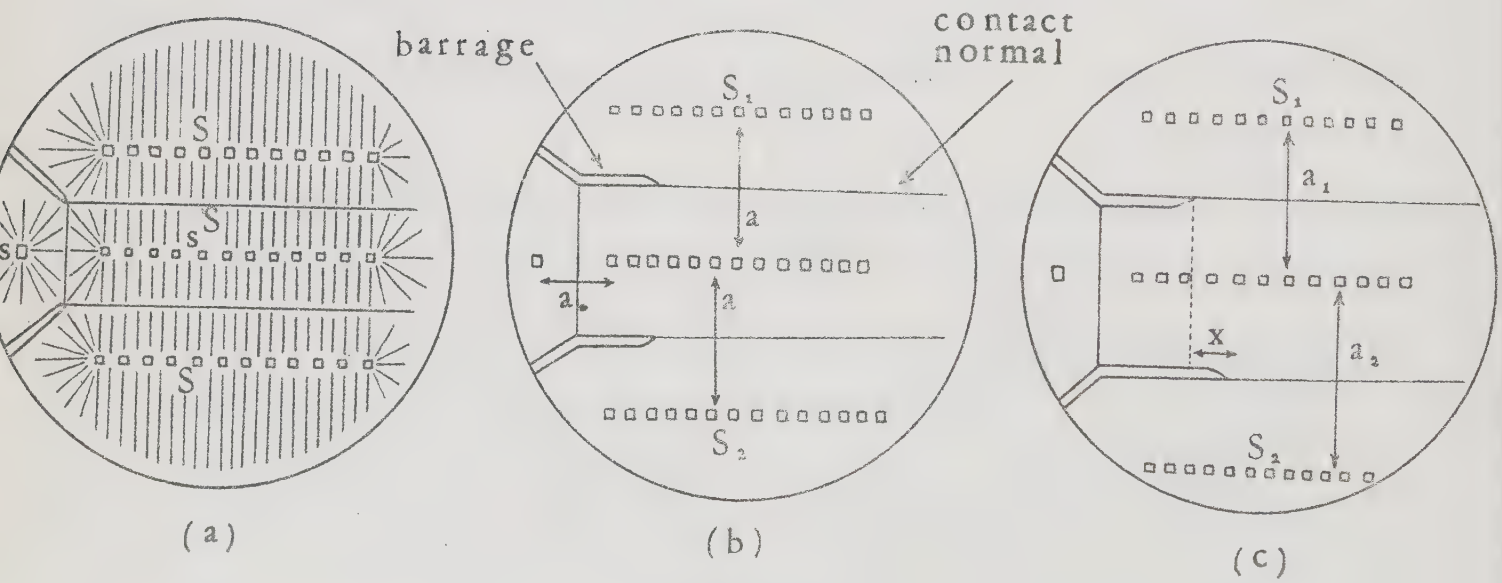


FIGURE 6

Mesure de la vitesse de propagation de la réversion (2ème technique). Explications dans le texte.

b) Deuxième technique : Cette technique permet de rendre visible, sur la culture elle-même, la marche de la réversion (Fig.6). On dispose en ligne de nombreux semis s^S, dont la croissance simultanée produit une bande de culture. Si l'on ensemence, de part et d'autre de la culture s^S, deux bandes S et que l'on induit la réversion à l'un des bouts de la culture s^S, l'aspect des contacts s^S/S dépend du temps écoulé entre ces contacts et le contact s/s^S. Si le contact s^S/s s'effectue au temps t_o et le contact s^S/S au temps $t_o + t$, on obtient, sur la ligne de contact s^S/S, un segment avec barrage correspondant à la partie de la culture s^S qui est réversée au moment du contact. La longueur de ce segment est proportionnelle à t, ou à la distance a entre les lignes de semis s^S et S (Fig.6, b). Si les lignes de semis S_1 et S_2 ne sont pas équidistantes de la ligne de semis s^S (Fig.6, c), le segment x représente la distance parcourue par la réversion entre le moment du contact s^S/S_1 et celui du contact s^S/S_2.

2°) Résultats

a) La vitesse de réversion varie avec la direction

Elle est très différente suivant qu'on la mesure dans la direction de croissance du thalle (1ère technique, direction a) ou dans la direction perpendiculaire (1ère technique, direction b et 2ème technique). On voit, sur le tableau III, qu'elle est maximale dans la direction radiale.

Que signifie cette différence ?

Si l'on réduit la taille des semis prélevés sur une culture en voie de réversion, sa propagation paraît discontinue et irrégulière (Fig.8). L'expérience suivante permet de préciser ce qui se passe. A une distance fixe du contact s^S/s, on prélève, à intervalles réguliers, des semis de 3 - 4 mm^2,

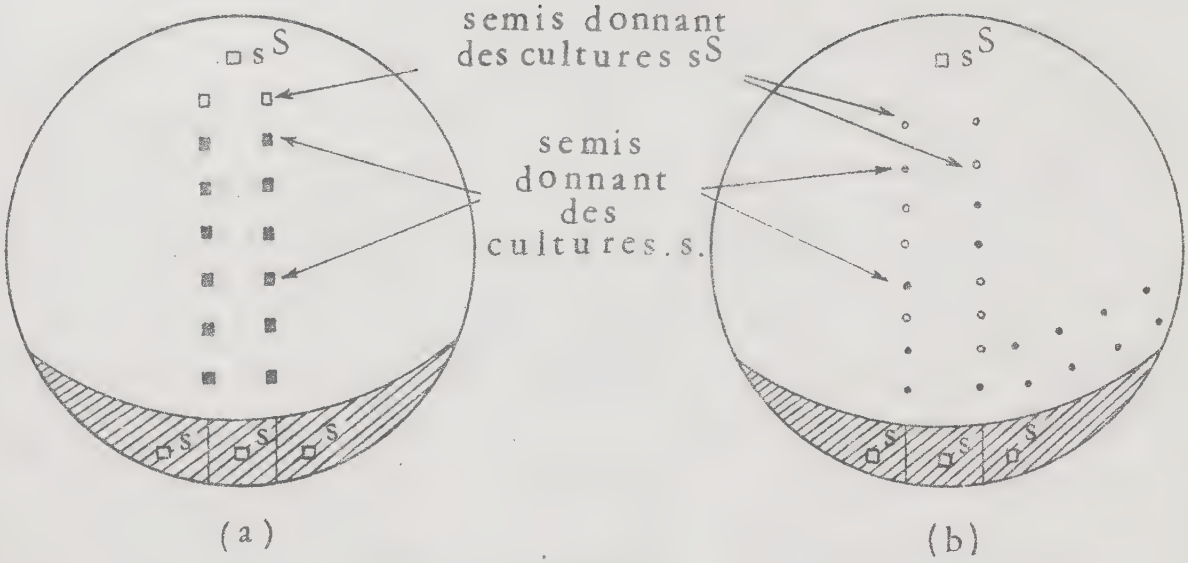


FIGURE 8

Représentation schématique de l'état d'une culture s^S en voie de réversion. (a) test effectué en prélevant de gros semis ; (b) test effectué en prélevant de petits semis.

TABLEAU II

Variation du pourcentage de filaments réversés en fonction du temps.

Temps à partir du contact s^S - s	Test global	test de fragments d'hyphes		
		réversés	total	% de réversés
6h	s^S	0	89	0
11	s^S	0	190	0
24	s	8	177	4
36	s	12	113	10
48	s	80	147	54
27	s	124	149	80

c'est-à-dire de taille habituelle ; au lieu de les tester globalement, on en isole un certain nombre de fragments d'hyphes, qu'on teste individuellement. On constate alors que le pourcentage de filaments réversés (Tabl. II) croît, avec le temps, de 0 à 100 %, et qu'un semis de taille habituelle donne une culture s même s'il ne contenait, au moment au prélèvement, qu'un très petit nombre d'hyphes réversées.

Autrement dit, sur son front de progression, la réversion n'intéresse qu'une très faible fraction des hyphes ; en arrière du front, la "densité de réversion" s'accroît.

Au contraire, dans la direction tangentielle (Fig.8, b), suivant laquelle la vitesse de progression est beaucoup plus faible, la réversion se propage d'une manière beaucoup plus homogène. Si l'on prélève de très petits semis ne comportant que quelques hyphes, on ne décèle jamais de discontinuité dans la zone réversée.

La vitesse mesurée tangentiellement à la direction de croissance traduit donc mieux l'état réel de réversion du thalle que la vitesse mesurée dans la direction radiale. A cause de la structure du thalle, qui, par ses grosses hyphes radiales, favorise, de manière aléatoire, la progression à grande distance de la réversion, la densité de réversion dans une culture s^S est très variable suivant les zones considérées ; mais la fraction réelle de mycélium réversé paraît bien s'accroître régulièrement en fonction du temps.

b) <u>La vitesse de réversion varie en fonction de la température</u>

Les chiffres du tableau III représentent les moyennes d'un grand nombre de mesures et correspondent à des vitesses de propagation dans des thalles jeunes. La comparaison avec la vitesse de croissance indique la

TABLEAU III

Influence de la température sur la vitesse de réversion et sur la vitesse de croissance.

Température		18°C	24°C	28°C
Vitesse de réversion (mm/j.)	dans la direction a	25	45	70
	dans la direction b	1,35	3	4,2
Vitesse de croissance (mm/j.)		2,35	5,5	7,5

similitude d'action de la température sur la croissance et sur la réversion ; pour ces deux phénomènes, le Q_{10} est sensiblement égal. Par la technique schématisée sur la figure 6 b, on constate d'ailleurs que, pour des distances $\underline{a}_o$ et $\underline{a}$ données, le chemin parcouru par la réversion au moment du contact s^S/S est indépendant de la température de croissance,: autrement dit, le rapport $\frac{\text{vitesse de réversion}}{\text{vitesse de croissance}}$ est constant sur un milieu donné.

c) La vitesse de réversion dépend de l'âge du mycélium

La vitesse décroît sensiblement lorsque la réversion, remontant de la zone la plus jeune vers la zone la plus âgée du thalle (Fig.5, a) atteint des hyphes âgées de plus de 10 jours. Si l'on fait vieillir une culture avant d'y déclancher la réversion, celle-ci se propage lentement (1 ou 2 cm par jour à 28° C, dans la direction radiale) et irrégulièrement. Cette constatation doit être rapprochée du fait que dans une culture âgée, de nombreux articles morts coupent la continuité des filaments et que la plupart des cellules sont

presque vides de cytoplasme ; d'autre part, dans une culture âgée, l'intensité des échanges entre les hyphes ou même entre articles contigus est très ralentie.

d) La vitesse de réversion dépend de la richesse du milieu de culture

Le tableau IV compare la vitesse de réversion dans les cultures s^S faites sur deux milieux différant par la concentration des éléments nutritifs : MN représente le moût de maïs normal ; MN/5, le même milieu dilué 5 fois par de l'eau distillée. Chaque chiffre correspond à la moyenne de douze mesures. On voit que la vitesse de croissance ne paraît pas affectée par la

TABLEAU IV

Influence de la concentration du milieu de culture sur la vitesse de réversion.

Milieu de culture		MN	MN/5
Vitesse de réversion (mm/j.)	dans la direction a	55	26
	dans la direction b	3,8	1,8
Vitesse de croissance (mm/j.)		6	6

dilution, mais en fait, le chiffre de 6 mm par jour ne traduit que la vitesse d'extension radiale de la culture, c'est-à-dire de l'allongement des hyphes. La croissance réelle de la culture, que l'on peut grossièrement apprécier d'après la densité du thalle, est différente sur ces deux milieux : sur le moût de maïs dilué, la culture est nettement plus pauvre ; de plus, la quasi absence

de pigment traduit le ralentissement de l'activité métabolique sur ce milieu.

e) La réversion est stoppée en l'absence d'oxygène

Si on place des cultures s^S en voie de réversion sous atmosphère d'azote, la propagation de la réversion s'arrête totalement, de même que la croissance et toute l'activité métabolique.

En résumé, on peut noter que tous les facteurs qui agissent sur la vitesse de réversion d'une souche s^S agissent dans le même sens sur la croissance : la propagation de la réversion paraît liée à un processus biosynthétique.

II. LE DETERMINISME DE LA REVERSION

Provoquée à tout coup par le contact cytoplasmique avec une souche s, la réversion peut aussi se produire spontanément dans une culture s^S. Toutes les souches s^S présentent cette propriété. Il s'agit là d'une propriété permanente qui est transmise même par une microconidie, c'est-à-dire un noyau isolé ; aussi peut-on considérer que tout noyau d'une souche s^S possède l'information nécessaire à l'expression du phénotype s.

La réversion, une fois apparue en un point d'une culture, se propage exactement comme nous venons de le voir et la souche s obtenue est identique à celle résultant d'une réversion provoquée. Aussi peut-on se demander quelle relation existe entre cette capacité permanente des noyaux des souches s^S et l'action du contact cytoplasmique avec s. Pour essayer de répondre à cette question, nous avons cherché d'autres facteurs susceptibles de provoquer la réversion.

A - FREQUENCE DE LA REVERSION SPONTANEE.

Dans les conditions habituelles de culture (à 26-28° C, sur moût de maïs gélosé) la réversion spontanée est un évènement rare et aléatoire. On peut apprécier sa fréquence d'après le pourcentage de culture s^S d'une taille donnée qui subissent une réversion au cours de leur croissance. La figure 9 indique une technique simple de mesure : toute réversion se produisant avant le contact avec la souche S centrale se révèlera par un barrage (RIZET, 1952). Dans ces conditions, on trouve de 1 à 2% de cultures ayant subi une réversion spontanée.

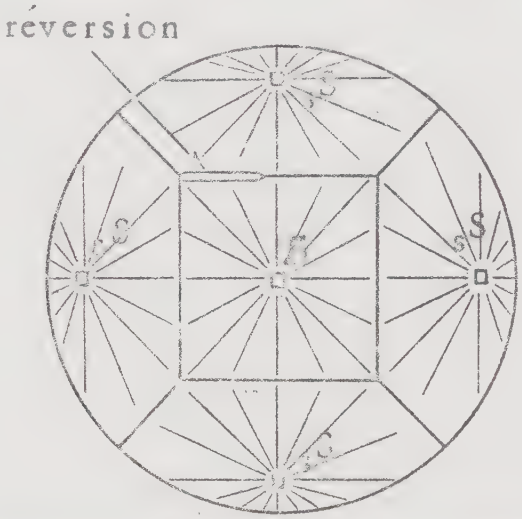


FIGURE 9 : Technique de détection des réversions spontanées.

La signification de ce chiffre n'est pas commode à préciser. A quelle unité le rapporter ? La structure de l'organisme ne permet pas d'évaluer avec une précision convenable le nombre de divisions cellulaires et il serait extrêmement laborieux d'effectuer une mesure acceptable de la croissance. Si l'on évalue très grossièrement le nombre d'énergides contenu dans une de ces cultures dont 1 à 2% réversent, on trouve une fréquence de réversion spontanée de l'ordre de 10^{-7} par énergide.

La réversion spontanée est donc un évènement dont la probabilité est comparable à celle d'une mutation génique.

B - INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS SUR LA FREQUENCE DE REVERSION SPONTANEE.

1°) Température - Comme l'indique le tableau V, la température a une action négligeable sur la fréquence de réversion spontanée.

TABLEAU V

Influence de la température sur la fréquence de réversion spontanée.

Température	20°C	28°C
Nombre de cultures réversées	22	12
Nombre de cultures testées	930	922
% de cultures réversées	2,3	1,3

Des chocs de température (passage de 36° à 4° C et l'inverse) ne modifient pas le taux de réversion. Le chauffage à sec, à 95° C, pendant 1 h ou 2 h, de spores s^S n'affecte pas non plus la fréquence de réversion des cultures qui en dérivent.

2°) Irradiation U.V. - Nous avons irradié en grand nombre des suspensions de cultures s^S mixées. Nous avons irradié également de jeunes cultures sur cellophane : en mettant un très petit semis sur une rondelle de cellophane posée sur un milieu nutritif gélosé, la culture n'a qu'une seule couche de

filaments à la surface de la cellophane, ce qui permet une irradiation homogène. Dans l'un et l'autre cas, avec des doses sub-léthales pour les cellules apicales du thalle (de l'ordre de 600 à 900 ergs/mm^2) nous n'avons obtenu aucune modification de la fréquence de réversion spontanée.

3°) Composition du milieu de culture

Nous avons cultivé des souches s^S sur divers types de milieu : des milieux complexes (Sabouraud, malt, extrait de levure, milieux peptonés), des milieux très pauvres (eau gélosé) des milieux synthétiques (ceux de MICHELL, de TAVLITZKI et des variantes de ces milieux). Au milieu usuel (moût de maïs) nous avons ajouté des agents toxiques ou des inhibiteurs de la croissance : streptomycine (jusqu'à 16 g/l) sorbose, forte concentration de glucose (jusqu'à 30%). Sur aucun de ces milieux la croissance n'est comparable à celle obtenue sur le milieu usuel ; aussi, à cause de la difficulté de mesure des croissances, nous sommes-nous bornés à rechercher si l'un ou l'autre de ces milieux aurait un effet important sur la fréquence de réversion spontanée. En testant, pour chacun de ces milieux, une centaine de cultures s^S suivant la technique décrite plus haut (Fig.9), nous n'avons constaté aucune modification de la fréquence de réversion.

4°) Génotype

Le tableau VI compare les fréquences de réversion spontanées de souches s^S différant par un gène connu. On voit que ces différences géniques n'affectent pas le taux de réversion spontanée. Il est vrai qu'entre ces souches, les différences génétiques sont réduites. Mais des souches s^S issues de croisements entre races géographiques : S x M (RIZET, 1953), S x A (BERNET, non publié) et offrant donc une beaucoup plus grande diversité génétique, ne montrent pas

TABLEAU VI

Influence du génotype sur la fréquence de réversion spontanée.

Souche	s^S	ps^S	fs^S
Nombre de cultures réversées	4	5	4
Nombre total de cultures	571	568	564
% de cultures réversées	0,8	0,9	0,8

non plus de différence dans leur taux de réversion spontanée (loc. cit.).

C - INFLUENCE DE DIVERS CONTACTS PROTOPLASMIQUES SUR LA REVERSION.

Nous n'avons donc pas trouvé d'autre moyen de provoquer la réversion que le contact protoplasmique avec une souche s. Dans les expériences précédentes, ce contact s'effectuait entre une souche s et une souche s^S, dont la seule différence génétique connue était le caractère d'incompatibilité avec S. Dans ces conditions, on ne peut distinguer nettement le déclanchement de la réversion de sa propagation, puisqu'une fois réversée, la souche s^S est identique à la souche inductrice. Aussi avons-nous cherché d'une part à provoquer la réversion d'une souche s^S donnée par le contact avec des souches génétiquement très différentes d'elle ; nous avons recherché d'autre part si les modalités de la réversion provoquée par une même souche s variaient avec le génotype de la souche s^S.

1°) Action réversante de diverses souches

Pour étudier l'action d'une souche sur la réversion, on la confronte, suivant les techniques précédemment décrites (Fig.5 et 6), avec une souche s^S donnée. Même s'il se forme un barrage entre les souches confrontées, des anastomoses s'établissent à leur contact et font communiquer les deux protoplasmes. Pour déceler l'effet de ce contact, il suffit alors, suivant la technique utilisée, soit de prélever des semis sur la souche s^S et d'en tester le caractère s ou s^S, soit de constater la présence ou l'absence de barrage sur les contacts s^S/S. L'une et l'autre technique permettent de mesurer la vitesse de propagation de la réversion, si elle est déclanchée. Grâce à l'absence de migration nucléaire entre souches confrontées, le repiquage de la culture s^S permet de vérifier si elle a subi d'autres modifications que celles concernant le caractère d'incompatibilité.

Le témoin de ces expériences est constitué par la confrontation de la souche s^S avec elle-même réversée spontanément, situation qui réduit au seul caractère cytoplasmique d'incompatibilité la différence entre les deux souches.

Le tableau VII groupe les résultats obtenus, qui peuvent se résumer ainsi :

- 1 - Les souches qui possèdent le gène s, mais différent de la souche s^S par des caractères morphologiques (cf. Chap. I), ont la même action que la souche s de référence.

- 2 - Les diverses races géographiques étudiées, qui font toutes barrage avec la souche s^S et possèdent des génotypes très variés, se groupent en 3 catégories.

a) 5 n'ont pas d'effet réversant ;

TABLEAU VII

Action de différentes souches sur la réversion.

Souche	Action réversante		déclanchement de la réversion	caractères de la souche réversée
	régulière	irrégulière		
s	+		immédiat	sauvages
sI	+		"	"
sp	+		"	"
sf	+		"	"
sb	+		"	"
A	+		"	"
B	-	-	-	-
C	-	+	immédiat	sauvages
D	-	-	-	-
E	+		immédiat	sauvages
F	-	-	-	-
G	-	+	immédiat	sauvages
H	-	-	-	-
K	-	-	-	-
M	+		immédiat	sauvages
N	+		"	"

b) 4 ont une action réversante aussi régulière que la souche témoin, ce sont les souches A, M, N et E. Trois d'entre elles A, M et N

ont été analysées génétiquement et l'on sait qu'elles possèdent le gène s.

c) Les deux autres souches, G et C, ont une action irrégulière en ce sens qu'une faible proportion seulement des contacts sont efficaces.

Il faut noter que l'effet réversant de ces souches se manifeste malgré le barrage ; autrement dit, la réversion est induite avant que la réaction d'incompatibilité ne coupe le contact entre les souches. L'effet réversant peut dépendre de la vitesse relative des deux phénomènes ; là réside sans doute l'explication de l'action irrégulière des souches G et C : chez ces souches en effet, le barrage provoque la mort bien au-delà des articles mixtes et il est vraisemblable que, la plupart du temps, la mort "rattrape" la réversion.

- 3 - Une fois déclanchée dans la culture s^S, la réversion se propage toujours à la même vitesse, quelle que soit la souche inductrice.

- 4 - Quelle que soit la souche inductrice, la souche s^S réversée conserve toutes ses propriétés, au caractère s près. Autrement dit, la souche inductrice ne transmet à la souche s^S aucune autre modification décelable que celle du caractère d'incompatibilité. Ceci est vrai en particulier pour les souches sf et sI, qui diffèrent aussi des souches sauvages par les modalités de leur réaction d'incompatibilité (cf. Chapitre II p. 23).

2°) Influence du génotype de la souche s^S sur les modalités de sa réversion

Comme variants génotypiques des souches s^S nous avons étudié des souches $s^S I$, $s^S f$ et $s^S p$.

La vitesse de réversion d'une souche ps^S est dentique à celle d'une souche s^S sauvage. Mais la réversion se propage dans une souche $s^S f$ légèrement

plus vite et, dans une souche $s^S I$, nettement plus lentement que dans une souche s^S sauvage. Ces caractères sont indépendants du génotype de la souche inductrice.

De même, quelle que soit la souche inductrice, ces souches s^S conservent, une fois réversées, toutes leurs propriétés : phénotype, vitesse de croissance, particularité de la réaction d'incompatibilité.

III. CONCLUSIONS DE LA PREMIERE PARTIE

Pour la commodité de l'exposé, nous parlerons du facteur cytoplasmique s, bien que rien ne permette pour l'instant d'en préciser la nature. Cette expression se justifie dans la mesure où ce facteur est le seul élément repérable, dans le phénomène d'infection d'une part, dans la réaction d'incompatibilité d'autre part. La présence ou la forme active du facteur cytoplasmique s conférerait le phénotype s, son absence ou sa forme inactive définirait le phénotype s^S. Lorsque la réversion se propage dans une culture s^S, tout se passe comme si cette propagation résultait de la synthèse progressive de facteurs cytoplasmiques s.

D'autre part, toute souche s^S, puisqu'elle peut réverser spontanément, possède, dans chacun de ses noyaux, l'information nécessaire à la synthèse de ces facteurs. Aussi peut-on envisager de deux manières le mécanisme de la réversion provoquée par contact protoplasmique : ou bien la souche inductrice transmet des facteurs cytoplasmiques s, qui se multiplient dans la souche s^S, ou bien elle provoque dans la souche s^S, au niveau des anastomoses, une modification chimique plus ou moins spécifique qui a pour effet d'induire la synthèse des facteurs cytoplasmiques par le protoplasme s^S.

Rien ne permet, momentanément, d'éliminer l'une ou l'autre de ces hypothèses, mais deux faits sont en faveur du deuxième type de mécanisme : 1°) le fait que des souches génétiquement très différentes de la souche s^S et dont certaines ne possèdent peut être pas le facteur s, ni même le gène s, puissent induire la réversion ; 2°) le fait que dans tous les cas, le rythme de propagation de la réversion ne dépende que du génotype et de l'état physiologique de la souche s^S.

2 - LA TRANSFORMATION $s \rightarrow s^S$

Si la transformation $s^S \rightarrow s$ résulte de la propagation du facteur cytoplasmique s, quel est le mécanisme de la transformation $s \rightarrow s^S$, régulièrement opérée au cours des croisements S x s ? Dans quelles conditions s'effectue la perte ou l'inactivation du facteur s ? Pour répondre à ces questions, nous essaierons d'abord de provoquer la transformation $s \rightarrow s^S$ autrement que sous l'action des souches S ; nous essaierons ensuite de comprendre le rôle de S dans cette transformation en analysant les croisements S x s.

I. RECHERCHE DE DISCONTINUITES DANS LES PROPRIETES DES SOUCHES s

Peut-on trouver des discontinuités dans les propriétés des souches s ? De la même manière que chez S. cerevisiae on trouve des "petites" parmi les bourgeons formés par les "grandes" (EPHRUSSI, HOTTINGUER et CHIMENES, 1949) ou que chez la Drosophile, on observe, au moment de l'isolement des cellules

germinales primordiales, des cas de perte de virus σ^- génétique (ICONOMIDIS et L'HERITIER, 1960), peut-on trouver des éléments d'une souche s qui ne soient pas s ?

A - ETUDE DE PETITS FRAGMENTS DE THALLE.

Nous avons envisagé, dans le Chapitre I, les différentes techniques permettant d'obtenir de très petits fragments d'une souche.

1°) fragments d'hyphes - des centaines de fragments d'hyphes, isolés par broyage de thalles s, n'ont jamais donné de cultures qui ne soient pas s. Notons que la même technique permet d'isoler environ 1% de filaments "sains" à partir d'un thalle sénescent du P. anserina (MARCOU, 1957).

2°) articles isolés - au cours de diverses expériences, nous avons isolé plus d'une centaine d'articles s, souvent très courts (10-15 µ) : ils étaient tous s.

3°) protoplastes - les protoplastes sont de taille très variable, mais les plus petits d'entre eux contiennent environ le tiers du volume de cytoplasme d'un article moyen. Une trentaine en tout, dont une douzaine de très petits, ont bien voulu redonner des thalles, qui étaient tous s.

Si le facteur cytoplasmique s est particulaire, les particules sont, dans une souche s, suffisamment nombreuses, pour ne pas risquer d'être perdues, même dans un échantillon de cytoplasme inférieur au contenu d'un article. Ne pouvant étudier de plus petits échantillons de thalle s, nous avons recherché si les "particules" ne seraient pas raréfiées par suite de modifications physiologiques des articles.

B - ETUDE D'ELEMENTS DU THALLE PHYSIOLOGIQUEMENT MODIFIES.

1°) Les différents éléments étudiés

Ces éléments physiologiquement modifiés sont soit des éléments de différenciation normale du thalle (conidiophores), soit des éléments expérimentalement modifiés (articles apicaux réduits, microconidies anormales).

a) Articles apicaux réduits - Les articles apicaux sont normalement longs d'une centaine de µ : le cytoplasme y est dense et non vacuolisé. Si on isole un tel article, avant toute croissance ou régénération à sa base, il se cloisonne et c'est généralement par l'article basal ainsi différencié que reprend la croissance. On peut encore réisoler l'article apical, déjà raccourci de 20 ou 30 µ : le processus de différenciation d'un article basal se reproduit. On obtient ainsi, en 5 ou 6 sections successives, un article apical de 8 à 10 µ, dont la capacité de croissance est généralement réduite, parfois nulle. Cet article réduit est, dès la première section, physiologiquement anormal comme l'indique la nécessité de la différenciation d'un article basal pour la reprise de la croissance.

Les travaux de ZALOKAR (1959) sur Neurospora, qui montrent que les articles apicaux présentent un gradient de différenciation enzymatique, permettent de penser que nos articles réduits possèdent un équipement enzymatique tout à fait incomplet.

b) Conidiophores - Les conidiophores sont des articles différenciés pour la production des microconidies. Ces articles, très pauvres en cytoplasme, sont le siège de divisions nucléaires actives, puisqu'un même article peut produire 2 ou 3 bouquets de 10 à 20 conidies. Ce sont généralement des articles très courts (5 - 10 µ) et souvent incapables de régénérer ; s'ils y

parviennent, c'est avec un long retard, et parfois leur croissance ne devient normale qu'après 24 ou 48 h.

c) Microconidies anormales - Les microconidies s ne transmettent jamais le facteur s, puisque la descendance des croisements ♀ s^S x ♂s est toujours s^S (RIZET, 1952). Aussi serait-il intéressant de connaître leur phénotype. Mais les microconidies sont normalement incapables de germer. Cependant, les microcondies formées par des souches cultivées sur un milieu au sorbose (cf. Chapitre I, p. 13) offrent une grande variabilité de taille. Supposant que certaines d'entre elles contenaient un peu plus de cytoplasme que les microconidies normales, nous avons essayé d'en faire germer : soit en étalant sur milieu gélosé des suspensions de ces microcondies, soit en les mettant dans des microgouttes de milieu, dans la chambre à huile.

La grande majorité de ces microconidies sont incapables de germination Un petit nombre d'entre elles effectue un début de développement plus ou moins anachique, par bourgeonnement ou allongement d'une hyphe d'aspect anormal ; après une certaine croissance, la mort survient. Un nombre encore plus réduit de ces microconidies germent et donnent des thalles normaux.

2°) Résultats

Le tableau VIII indique les phénotypes de tous les éléments étudiés.

Les phénotypes des articles apicaux et des conidiophores sont testés dès l'isolement, par anastomose avec une hyphe S ; les microconidies (b), germées en chambre à huile sont testées lorsque le tube germinatif a quelques centaines de µ ; les microconidies (a), germées sur maïs gélosé, sont testées en boîte de Pétri, après 4 jours de croissance.

TABLEAU VIII

Type d'élément étudié	phénotypes			
	s	s retardé 2-5 h.	s retardé 1-2 j.	s^S
articles apicaux	9	3	2	
conidiophores	10	1	2	1
microconidies (a)	22			2
(b)	5		1	2

a) Un phénomène nouveau apparaît : avec les différents types d'éléments, on observe toute une gamme de phénotypes s à expression retardée. La réaction d'incompatibilité n'apparaît qu'après un délai qui va de quelques heures à deux ou trois jours. Dans tous les cas, la réaction d'incompatibilité n'apparaît qu'après une certaine croissance de l'élément déficient.

b) Nous avons obtenu des transformations $s \rightarrow s^S$: 1 cas à partir d'un conidiophore, plusieurs cas à partir de microconidies. Les souches s^S obtenues de cette manière ont toutes les propriétés des souches s^S issues des croisements S x s.

3°) Discussion

a) L'obtention de microconidies s^S indique que la transformation $s \rightarrow s^S$ est possible sans l'intervention d'une souche S.

b) Dans le cas du conidiophore de phénotype s^S, les conditions expérimentales ne permettent pas de préciser si cet article était s^S ou l'est devenu par suite du contact protoplasmique très précoce avec l'hyphe S. Si cette transformation s'est opérée sous l'action de S, on voit que cette action peut s'exercer autrement qu'au cours du croisement S x s. Il est intéressant de

rappeler à ce propos que, dans le phénomène décrit chez le maïs sous le nom de "paramutation", la transformation régulière du caractère R^r en R' dans l'hétérozygote R^r/R^{st}, qui paraissait d'abord s'effectuer au cours de la méiose, se produit en fait dans les cellules somatiques (BRINK, 1960).

c) L'obtention de toute une gamme de phénotypes intermédiaires entre s et s^S révèle un aspect quantitatif du phénotype s et paraît traduire la raréfaction du facteur cytoplasmique s. Le fait que la réaction d'incompatibilité n'apparaisse qu'après une certaine croissance de l'élément indiquerait alors que la réaction ne peut se produire qu'au-dessus d'une certaine concentration de facteur cytoplasmique et que cette concentration ne peut augmenter que lorsque le petit élément a repris une activité métabolique normale.

d) La transformation $s \rightarrow s^S$ apparaît alors comme un cas extrême de la raréfaction du facteur s et peut être interprétée comme traduisant la perte de ce facteur. Cette perte se présente comme un évènement aléatoire, dont la probabilité s'accroît à certains stades, naturels ou artificiels, de la différenciation des filaments, et qui sont consécutifs à une active multiplication nucléaire sans accroissement correspondant de la quantité de cytoplasme.

II. ANALYSE DES CROISEMENTS S x s

Si les microconidies ne transmettent pas le facteur s, les deux croisements réciproques S x s, bien qu'ils donnent la même descendance $S + s^S$, correspondent à des situations différentes. Dans le croisement ♀s x ♂S, en effet, l'ascogone fécondé contient le facteur s et la transformation résulte de l'intervention du gène S. Dans le croisement ♀S x ♂s au contraire, l'ascogone

fécondé ne contiendrait pas de facteur s, ce qui est, d'après les résultats précédents, une condition suffisante de la transformation $s \rightarrow s^S$.

Pour vérifier s'il existe bien une différence entre les deux croisements réciproques et essayer de comprendre le mode d'action du gène S sur la transformation $s \rightarrow s^S$, nous nous sommes basés sur le fait suivant : on trouve parfois, dans la descendance de croisements S x s, des souches s que leur rareté avait, jusque là, fait considérer comme résultant de réversions très précoces des souches s^S.

S'il s'agit bien de réversions précoces, les quatre croisements, I : ♀s x ♂S, II : ♀S x ♂s, III : ♀s^S x ♂S et IV : ♀S x ♂s^S, qui ont la même descendance mixte S + s^S, offrent la même probabilité d'en contenir. Au contraire, si ces rares souches n'étaient pas dues à des réversions précoces mais à la persistance rare et aléatoire du facteur s, seul le croisement ♀s x ♂S devrait en donner. Pour préciser ce point, la seule difficulté, due à la rareté de ces souches s, était d'ordre technique.

A - TECHNIQUE DE L'ANALYSE.

L'observation suivante nous a fourni une technique d'analyse : parmi quelques centaines de spores S et s^S, semées en masse sur un milieu gélosé, on peut déceler la présence de spores s, fût-ce d'une seule, si elle germe. En effet, grâce au pouvoir infectant du caractère s, on a presqu'aussitôt un mélange de filament S et s. Un tel mélange donne une culture d'aspect tout à fait particulier (cf. Chap. II, p. 26). Au contraire, en l'absence de spores s, le mélange S + s^S donne un mycélium normal. On peut donc, en semant globalement le contenu d'un périthèce, y détecter la présence de spores s, même rares, et

étudier facilement la descendance d'un grand nombre de zygotes de chacun des 4 croisements.

B - RESULTATS.

Le tableau IX indique les résultats obtenus.

TABLEAU IX

Croisement	I:♀s x ♂S	II:♀S x ♂s	III:♀s^S x ♂s	IV:♀S x ♂s^S
Nombre de périthèces avec spores s	79	2	0	0
Nombre de périthèces étudiés	1030	943	509	377
% des périthèces avec spores s	7,5	0,2	0	0

On constate une différence tout à fait significative entre le croisement I et les croisements II, III, IV : dans ceux-ci, les fréquences de spores s sont statistiquement égales et représentent vraisemblablement la fréquence des réversions spontanées des spores s^S dès la germination. Au contraire, dans le croisement I, le seul où la souche ♀ soit s, la fréquence des spores s est significativement plus élevée et traduit un autre phénomène : ces spores s, qui ne représentent pas des réversions très précoces, doivent résulter de la persistance rare du facteur cytoplasmique s.

Cette fréquence de 7,5% est très sous-estimée : dans ces expériences, en effet, les paquets d'asques étaient semés sur un milieu (moût de maïs gélosé)

qui permet de bien voir les mélanges d'hyphes (S + s), mais où le pourcentage de spores qui germent est faible. Ultérieurement on a pu obtenir, sur le même milieu, la germination de toutes les spores en les faisant prégermer (cf. Chap.I, p. 13). Dans ces conditions, on trouve, dans le croisement I, jusqu'à 50% de périthèces contenant des spores s, leur pourcentage dans les croisements II, III et IV restant voisin de 0.

Les résultats obtenus par cette technique ne renseignent pas sur le nombre de spores s par périthèce et ne permettent pas de savoir s'il existe deux types de périthèces, les uns contenant de nombreuses spores s et les autres aucune, ou s'il existe une probabilité égale pour tous les périthèces d'en contenir un petit nombre. Pour préciser ce point, nous avons étudié individuellement des asques issus du croisement I : sur 727 asques prélevés dans 48 périthèces, un seul contenait une ou deux spores s. Comme, de plus, on n'a jamais rencontré, au cours de multiples analyses spore par spore d'asques issus de ce croisement, de spores s groupées, on peut admettre que tous les périthèces ont une probabilité égale de contenir des spores s en petit nombre, de l'ordre de 0, une ou deux.

En résumé, les 4 croisements qui ont la même descendance mixte $S + s^S$ se rangent en deux catégories :

- dans la première, qui groupe les croisements ♀S x ♂s, ♀s^S x ♂S et ♀S x ♂s^S, la descendance ne contient pratiquement jamais de spores s ;
- dans la deuxième, qui correspond au seul croisement où le parent ♀ soit s, chaque périthèce offre une certaine probabilité de contenir des spores s parmi sa descendance s^S.

C - CONCLUSIONS.

L'analyse du croisement ♀s x ♂S permet une interprétation de l'action du gène S. La rareté de la persistance du facteur cytoplasmique s, dans 1 asque sur 100 environ, peut être reliée à l'énorme accroissement de masse de cytoplasme qui correspond à la formation de 400 spores en moyenne à partir de l'ascogone fécondé. On peut supposer que le gène S ne provoque pas l'élimination totale du facteur s, mais inhibe seulement sa formation. Les facteurs initialement présents dans l'ascogone se trouveraient dilués et n'auraient qu'une faible chance de se trouver englobés dans une spore de génotype s.

III. CONCLUSIONS DE LA DEUXIEME PARTIE

Les faits rapportés dans la deuxième partie de ce chapitre permettent de tirer les conclusions suivantes quant à la nature du facteur cytoplasmique s et au mécanisme de la transformation $s \rightarrow s^S$.

1°) Nous avons observé des discontinuités dans la transmission du facteur s, soit dans la descendance du croisement ♀s x ♂S, soit parmi les microconidies s formées en présence de sorbose. Nous avons d'autre part observé des phénotypes intermédiaires entre s et s^S qui paraissent traduire des variations de concentration du facteur s dans le cytoplasme. Mais ces faits ne permettent pas, à eux seuls, de conclure que le facteur s soit une particule génétique ; comme l'ont souligné LEDERBERG et LEDERBERG (1956), l'observation de discontinuités dans l'hérédité ne prouve pas l'existence de particules et n'est qu'une "formal description of cell division, a mathematical simplification, that leaves untouched the question of their materiality".

2°) La possibilité d'obtenir la transformation $s \rightarrow s^S$ sans l'invention d'une souche S indique que l'expression du phénotype s^S peut résulter directement d'un évènement aléatoire que nous pouvons interpréter comme la perte du facteur cytoplasmique s.

3°) L'analyse des croisements S x s nous a montré que l'action du gène S pourrait être d'inhiber la synthèse du facteur s ; ceci permettrait de comprendre que les deux croisements réciproques S x s aboutissent au même résultat à partir de situations différentes.

3 - CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Dans une souche s^S, aussi bien que dans une souche s, tous les noyaux possèdent l'information nécessaire à la production du facteur cytoplasmique d'incompatibilité s : comme cette potentialité n'est jamais perdue dans les croisements, ni affectée par la transformation $s^S \rightarrow s$ ou $s \rightarrow s^S$, on peut admettre que c'est le gène s lui-même qui contient cette information.

Mais le gène s, s'il contient l'information nécessaire à la synthèse du facteur s, ne suffit pas à assurer sa continuité cytoplasmique : la perte du facteur s est définitive, aux réversions spontanées près, dont la probabilité est de l'crdre de celle d'une mutation génique.

Cependant, la comparaison des conditions de réapparition et de disparition du facteur s indique que la synthèse de celui-ci est liée à l'activité des noyaux des souches s et s^S.

En effet, 1°) la raréfaction et la disparition du facteur cytoplasmique s'observent à la suite d'une phase de multiplication nucléaire active.

2°) la réapparition du facteur s, qu'elle résulte d'un évènement cellulaire aléatoire ou d'un contact avec un protoplasme étranger, s'effectue toujours à un rythme qui dépend de l'activité métabolique de la souche s^S.

C H A P I T R E I V

L E F A C T E U R C Y T O P L A S M I Q U E S

Le barrage entre souches S et s présente deux aspects : le premier est la réaction d'incompatibilité entre hyphes S et s, le second est la transformation $s \rightarrow s^S$ sous l'influence du gène S au cours des croisements S x s. Pour comprendre la relation entre ces deux types d'interactions entre les souches, nous avons cherché à définir le mode d'action du gène S sur le facteur cytoplasmique s. Nous avons pu mettre en évidence un facteur cytoplasmique d'incompatibilité S et étudier ses propriétés.

I. ACTION DES SOUCHES S SUR LES SOUCHES s

A - MISE EN EVIDENCE DU FACTEUR CYTOPLASMIQUE S.

Les gènes S et s étant allèles et la réaction d'incompatibilité entre hyphes S et s étant symétrique, on pouvait se demander si les souches S ne possédaient pas, comme les souches s, un élément cytoplasmique responsable de l'incompatibilité. L'existence du facteur s a été révélée par la modification $s \rightarrow s^S$, mais rien de semblable n'est connu pour le phénotype S. La seule possibilité d'identifier le facteur S d'incompatibilité reposait donc sur son éventuelle capacité de se manifester hors d'une souche S. Sachant qu'une souche hétérocaryotique $S + s^S$ a le phénotype S, nous avons cherché si le phénotype S

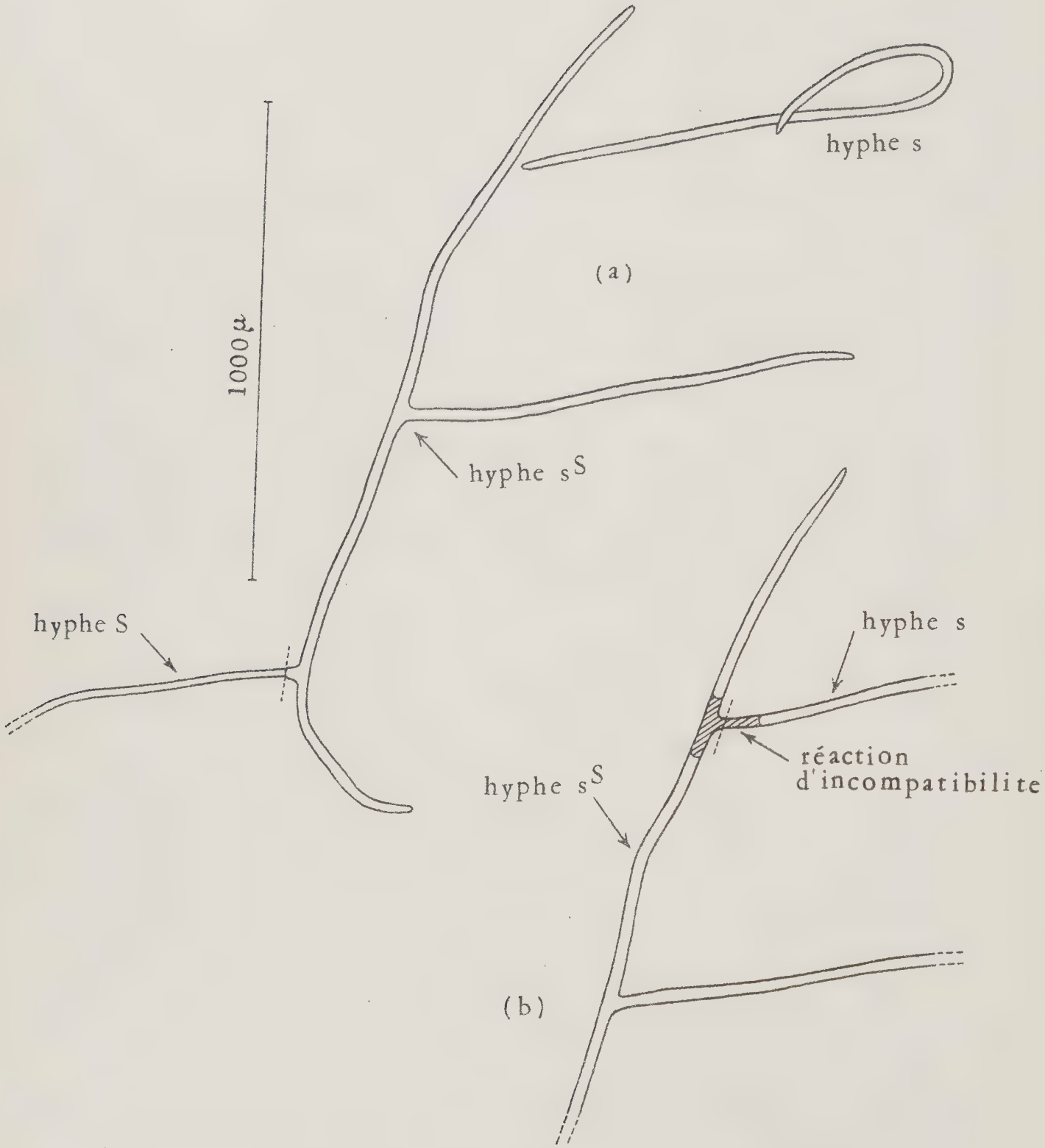


FIGURE 10

Mise en évidence du facteur cytoplasmique S. (Explications dans le texte).

était contagieux pour une hyphe s^S.

1°) Conditions expérimentales

La figure 10 schématise le principe de l'expérience. Une hyphe s^S, longue de 1000 à 1500 µ est anastomosée, près de l'une de ses extrêmités, à une hyphe S. On sait qu'il ne se produit pas d'échanges nucléaires entre les hyphes au-delà de l'article d'anastomose. Toute autre partie de l'hyphe s^S qui présenterait le phénotype S le devrait à la présence d'un élément non nucléaire venu de l'hyphe S.

Quelques heures après l'établissement du contact S/s^S, on anastomose des filaments s en divers points de l'hyphe s^S, par exemple à 200, 800, 1200 µ du contact S/s^S. Selon qu'on observe ou non une réaction d'incompatibilité aux contacts s^S/s, on en déduit que l'hyphe s^S avait ou non le phénotype S.

2°) Résultats

Généralement, une réaction d'incompatibilité se produit aux contacts $s - s^S$. Cette réaction se déclanche souvent aussi vite que lors d'un contact s - S, mais parfois avec un retard variable suivant les cas.

Pour une même hyphe s^S testée en plusieurs points, la réaction ne se produit pas toujours en tous les points ; dans ce cas, les réactions ne se localisent pas nécessairement aux points les plus proches du contact $S - s^S$.

3°) Conclusions

Il existe donc, dans les souches S, un élément responsable de l'incompatibilité avec s, qui peut migrer dans une hyphe s^S indépendamment des noyaux et lui conférer le phénotype S. Nous appelerons cet élément le facteur cytoplasmique S.

L'hyphe s^S ainsi "infectée" ne présente pas un phénotype S homogène : la répartition du facteur y est discontinue.

L'existence de réactions retardées, comparables à celles observées dans le cas d'article s, paraît ici aussi, traduire une variation de la concentration du facteur cytoplasmique S ; la réaction d'incompatibilité ne se produirait normalement que si le facteur cytoplasmique S est présent dans l'hyphe s^S en assez grande quantité.

B - PROPRIETES DU FACTEUR CYTOPLASMIQUE S.

1°) La présence du gène S est nécessaire au maintien du facteur cytoplasmique

La modification du phénotype s^S par le facteur cytoplasmique S n'est pas durable, comme l'indiquent les observations suivantes.

a) Si l'on isole, après infection par S, une hyphe s^S, dès qu'elle reprend sa croissance, elle perd le phénotype S.

b) Si l'on broye une souche hétérocaryotique S + s^S, de phénotype S, on obtient, à partir des fragments séparés, des cultures s^S qui ne conservent aucun souvenir de leur voisinage avec S.

c) On connaît un gène léthal qui, porté par le noyau S, dans un hétérocaryote S + s^S, provoque l'élimination progressive des noyaux S. Le phénotype de cet hétérocaryote devient s^S avant l'élimination totale des noyaux S.

Autrement dit, tout se passe comme si, une fois séparé des noyaux S, le facteur S d'incompatibilité se trouvait rapidement dilué.

2°) La présence du gène S suffit à l'apparition du facteur S

A la différence du facteur s, le facteur S est, dans tous les cas

connus, transmis en même temps que les noyaux S, en particulier par les microconidies. Dans un ascogone s ou s^S fécondé par un noyau S, le facteur cytoplasmique S est toujours reformé.

En résumé, le gène S est nécessaire et suffisant à l'apparition et au maintien du facteur cytoplasmique S, qui apparaît un intermédiaire transitoire de l'action du gène S dans la réaction d'incompatibilité.

C - MODE D'ACTION DU GENE S SUR LE FACTEUR s.

Nous avons vu que dans un croisement ♀s x ♂S, le gène S paraît inhiber la propagation du facteur s (Chap. III, p. 55).

L'analyse directe de cette action nécessiterait la réunion de noyaux S et de cytoplasme s. Cette situation pourrait être obtenue expérimentalement soit par transplantation nucléaire, soit par injection de cytoplasme ; mais l'organisme ne se prête pas à ce type d'expérience. Nous ne pouvions pas non plus étudier des contacts protoplasmiques S - s, puisqu'ils sont létaux. Mais les particularités de "l'infection" d'une souche s^S par le facteur d'incompatibilité S nous ont suggéré un moyen indirect pour étudier l'action des noyaux S sur le cytoplasme s.

1°) Conditions expérimentales

Le principe de l'expérience est d'étudier le sort du facteur s, amené par une hyphe s, dans un mélange protoplasmique S + s^S. La figure 11 schématise le dispositif expérimental. On peut obtenir un article mixte S + s^S (Fig.11 a) en isolant l'article en H formé par l'anastomose entre une hyphe s^S et une hyphe S. Cet article, limité par 4 cloisons, est constitué d'un mélange protoplasmique

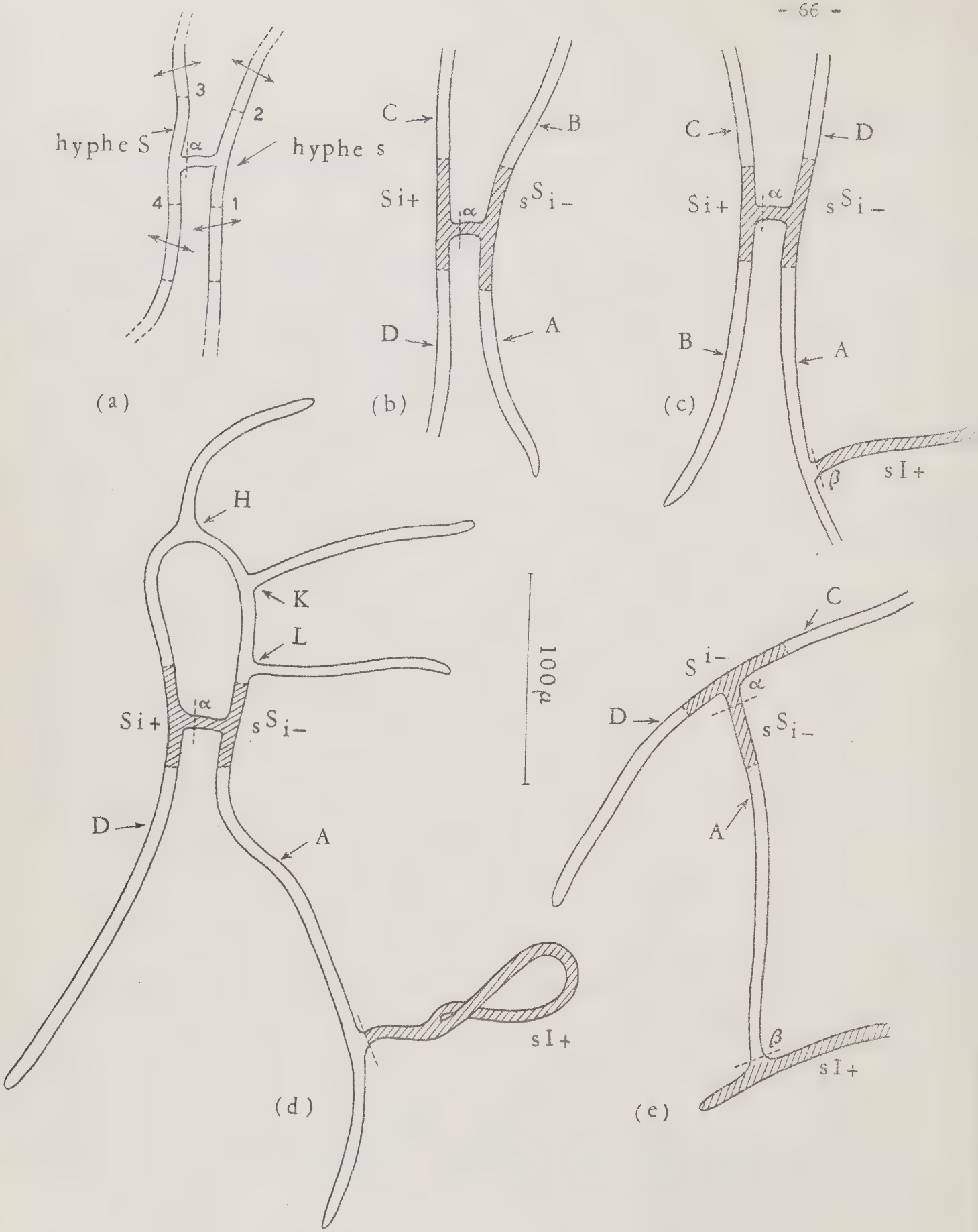


FIGURE 11 : Explications dans le texte.

relativement homogène ; la croissance de cet article s'effectue par ses 4 extrémités (Fig. 11, b). Chacune des 4 hyphes régénérées par l'article S + s^S peut être isolée, opération qui a pour effet de ramener l'article mixte à son état initial (Fig. 11, a). Sa croissance ultérieure donne à nouveau 4 régénérations, que l'on peut isoler, etc...

Si l'on étudie les caractères des régénérations successives formées par un article mixte contenant deux types de noyaux marqués (S/+ et s^S/- par exemple), on constate que chaque régénération ne contient qu'un type nucléaire, comme si un seul noyau était à l'origine d'une régénération. Les régénérations aux points 1, 2, 3 ou 4 (Fig. 11, a) sont S/+ ou s^S/- ; il y a une probabilité plus grande d'obtenir une régénération s^S aux points 1 et 2 et S aux points 3 et 4.

Si l'on anastomose une hyphe s à l'une des régénérations formées par la partie s^S de l'article mixte (Fig. 11, c), deux situations sont prévisibles : ou bien l'hyphe s^S manifestera le phénotype S et l'on observera en β une réaction d'incompatibilité, ou bien le facteur S sera rare ou absent et il n'y aura pas de réaction d'incompatibilité. Quel sera alors le sort des facteurs cytoplasmiques s dont la formation va débuter au point β ? Si la réversion se propage dans l'hyphe A, lorsque les facteurs s arriveront dans l'article mixte au voisinage des noyaux S, seront-ils éliminés, ou bien, si les gènes S inhibent seulement leur propagation, ne pourront-ils pas, lentement et au hasard, passer dans une régénération s^S ? Ce phénomène se traduirait par l'obtention d'une régénération de phénotype s, mais contenant les marqueurs des noyaux s^S.

2°) Résultats

Nous avons fait 6 expériences de ce type, à partir des souches

marquées : Si+, s^{S}i-, sI+.

a) Dans 4 cas, il s'est produit une réaction d'incompatibilité en β traduisant la présence d'une certaine quantité de facteur cytoplasmique S dans l'hyphe s^{S}.

b) Dans les deux autres cas (schématisés sur la figure 11, d et c) nous avons obtenu la situation espérée. Le tableau X indique le phénotype des cultures obtenues à partir des régénérations successives prélevées aux jours

TABLEAU X

Date	Régénérations aux points					
	D	H	K	L	C	D
22	S	s^{S}			S	S
23						
24	S	s^{S}		s^{S}	S	S
25	S	s^{S}	s^{S}	s^{S}		
26		s^{S}		s^{S}	S	S
27	S		s			
28					S	S
29				s	s	
	fig. 10 d				fig.10 e	

indiqués, l'anastomose avec la souche s/I/+ ayant été faite le 22 et interrompu le 26. Toutes ces cultures étaient homocaryotiques et les 3 cultures s obtenues avaient les caractères portés par les noyaux s^{S} de l'article initial.

L'absence de réaction d'incompatibilité indique que, pendant toute

la durée de l'expérience, la concentration du facteur s est restée faible. L'obtention de régénération s indique que les facteurs s apportés ou induits par l'anastomose sI, n'ont pas été détruits. Enfin, si l'on se rappelle la rapidité de l'infection d'une souche s^S par le phénotype s, il est clair que les facteurs cytoplasmiques s qui, dans ces expériences ont mis plusieurs jours à progresser de quelques 200 µ, se sont trouvés fortement inhibés.

3°) Conclusions

Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle le gène S inhibe la propagation du facteur s. L'inhibition s'exerce ici, et vraisemblablement aussi pendant le croisement s x S, par un intermédiaire cytoplasmique. Cet intermédiaire peut être le facteur d'incompatibilité mais rien ne permet de l'affirmer. Si ces deux éléments, associés au gène S ne faisaient qu'un, l'interaction des deux facteurs d'incompatibilité se traduirait, suivant les conditions de leur rencontre, soit par une réaction de barrage soit par l'élimination du facteur s.

Nous verrons que le résultat de l'interaction des 2 facteurs d'incompatibilité dépend effectivement des conditions de leur rencontre.

II. ACTION DES SOUCHES S SUR LES SOUCHES s^S

Le cytoplasme S exerce-t-il seulement une action inhibitrice sur la progression du facteur s ou agit-il également sur le déterminisme de son apparition ? Nous avons recherché si, en présence de noyaux et de cytoplasme S, la réversion spontanée du phénotype s^S pouvait se produire. Cette étude nous a révélé l'existence de deux types de souches S, différant par leur action sur cette réversion.

A - ACTION DES SOUCHES S SUR LA REVERSION DES SOUCHES s^S : MISE EN EVIDENCE DE DEUX TYPES DE NOYAUX S.

Pour étudier l'action des souches S sur la transformation $s^S \rightarrow s$, nous avons recherché le devenir du phénotype s^S : 1°) dans des souches hétérocaryotiques S + s^S, 2°) dans des souches s^S confrontées avec des souches S.

1°) Etude des souches hétérocaryotiques S + s^S

15 à 20% des asques issus de croisements S x s ou S x s^S sont post-réduits pour le couple de gènes S/s et leurs 4 spores fournissent des souches hétérocaryotiques S + s^S. Ces souches sont généralement stables et restent hétérocaryotiques dans toutes les cultures.

Si des réversions $s^S \rightarrow s$ peuvent se produire au sein de ces hétérocaryotes, elles créeront des zones S + s décelables de deux manières : in situ, on constatera la présence d'articles morts dans le thalle ; par repiquage, certains des semis prélevés sur la souche hétérocaryotique donneront des mélanges S + s, dont nous connaissons les particularités (Chap. II, p. 26).

a) Résultats - Si l'on observe à un fort grossissement du microscope des cultures (S + s^S) quelques jours après l'arrêt de leur croissance, on en trouve de 2 types, suivant l'origine de la souche parentale S : les unes contiennent une très grande proportion de filaments morts, les autres en sont à peu près dépourvues. Si on prélève sur ces cultures de nombreux semis, beaucoup de ceux issus du premier type d'hétérocaryote révèlent un mélange d'hyphes S + s, alors que les semis issus du deuxième type d'hétérocaryote donnent tous des cultures S + s^S normales, d'aspect homogène.

Il y a donc deux types de noyaux S, que nous appelerons SR et SNR. La présence des noyaux SR favorise sensiblement la réversion ; toute culture

s^S + SR, en effet, contient plusieurs zones de réversions, dont la plupart sont sûrement indépendantes, puisque la léthalité du mélange S + s s'opposerait à leur extension.

Il est difficile de préciser si la présence de noyaux SNR modifie la fréquence de la réversion spontanée, mais il est sûr qu'elle ne l'empêche pas : parmi des nombreux semis prélevés sur plusieurs centaines de cultures SNR + s^S, nous avons trouvé quelques mélanges S + s.

b) Conclusions - En aucun cas la réversion spontanée du phénotype s^S ne paraît totalement inhibée par le protoplasme S. De plus, certains noyaux S ont la propriété assez paradoxale de favoriser la réversion s s^S.

2°) Etude de confrontation s^S - S

On peut montrer autrement l'influence d'une souche S sur la réversion. On la confronte avec une souche s^S (Fig. 12) et l'on prélève des semis en divers

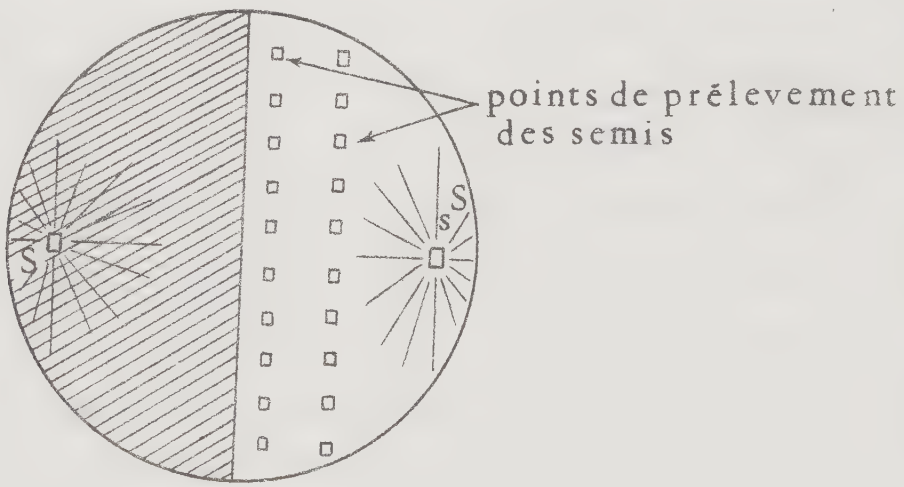


FIGURE 12 : Représentation schématique d'une confrontation s^S - S.

points de la souche s^S, à intervalles réguliers. Pour chacune des souches S étudiée, on teste une demi-douzaine de cultures.

a) Résultats - Il existe bien deux types de souches S.

α) Les unes provoquent la réversion des cultures s^S. Mais cette action s'opère tardivement et de manière aléatoire : d'une part la réversion n'apparaît, dans la zone du contact, que 7 jours environ après la rencontre des thalles ; d'autre part, elle ne débute qu'en un ou deux points le long de la ligne de contact. Une fois déclanchée, la réversion se propage normalement dans la souche s^S. La souche s obtenue est identique aux autres souches s.

β) Les autres souches S ne provoquent pas la réversion. Même après 2 semaines de contact, les cultures s^S ne montrent pas plus de réversions que si elles étaient seules.

b) Discussion - L'action réversante des souches SR, qui se manifeste dans les mêmes conditions que l'action des souches s, mais avec une efficacité beaucoup plus faible, peut s'intégrer aux résultats groupés dans le tableau VII (Chap. III, p.46). Ces résultats ne nous avaient pas permis de préciser le mécanisme de la réversion provoquée par les différentes souches et de savoir si elles favorisaient le déclanchement de la réversion spontanée ou si elles apportaient le facteur s. Il est bien évident qu'une souche SR n'apporte pas le facteur s ; il faut en conclure que le contact protoplasmique s^S/SR provoque, dans la souche s^S, une modification physiologique qui accroît sa probabilité de réversion spontanée.

III. ANALYSE GENETIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DES CARACTERES SR ET SNR

A - ANALYSE GENETIQUE DES CARACTERES SR ET SNR.

1°) Nous avons étudié la descendance de croisements SR x SNR, SR x s, SNR x s. Dans les croisements SR x SNR, les caractères SR et SNR ségrègent comme des allèles. Dans les croisements SR x s et SNR x s, les descendants S ont toujours le caractère R ou NR du parent S. Pour les trois couples de caractères : SR/SNR, SR/s et SNR/s, la fréquence de post-réduction est la même : 16% à 28° C. Le test du caractère SR ou SNR d'une souche S étant assez laborieux, nous n'avons pu analyser que 350 tétrades environ pour l'ensemble de ces croisements. Cette étude permet cependant de considérer que les gènes SR, SNR et s sont trois allèles, et que SR et SNR sont deux formes du gène S.

2°) Nous avons recherché des souches hétérocaryotiques SNR + SR. De telles souches dérivent de spores doubles isolées d'asques à 5 spores dont les deux spores uninucléées sont l'une SR et l'autre SNR. Nous avons étudié l'action de deux de ces souches SR + SNR sur les souches s^S : elles n'ont pas d'effet réversant. Le caractère SNR est donc dominant dans l'hétérocaryote.

B - PROPRIETES COMPAREES DES SOUCHES SR ET SNR.

Si les gènes SR et SNR sont deux allèles, on peut s'attendre à ce que leurs produits d'activités respectifs soient différents. Aussi avons-nous comparé les deux types des souches S pour toutes les propriétés que nous leur avons reconnues.

1°) L'aspect de la réaction d'incompatibilité avec s ne permet pas de

différencier les deux souches.

2°) Les souches SR, aussi bien que les SNR, sont susceptibles de modifier passagèrement le phénotype d'une hyphe s^S.

3°) Le résultat des croisements SR x s et SNR x s est identique ; en particulier il n'existe pas de différence entre les deux types de souches quant à la fréquence des périthèces ♀s x ♂S contenant des spores s (Tabl. XI).

TABLEAU XI

Analyse des croisements s x SR et s x SNR

Croisement	♀s x ♂SR	♀SR x ♂s	♀s x SNR	♀SNR x ♂s
Nombre de périthèces avec spores s	45	0	36	0
Nombre de périthèces étudiés	330	320	330	310
% des périthèces avec spores s	13	0	10	0

Leur action sur les souches s^S est donc le seul caractère qui permette de différencier les souches SR et SNR.

IV. CONCLUSIONS

L'étude de l'action des souches S sur les souches s et s^S nous a apporté divers types d'informations.

1°) Les deux types de souches S

Il existe deux sortes de souches S, SR et SNR qui correspondent à deux formes du gène S, et ne se différencient que par leur action sur les souches s^S. Leurs cytoplasmes ont la même action sur le facteur cytoplasmique s : ils sont incompatibles avec le cytoplasme s et ont une action inhibitrice sur la propagation du facteur s.

2°) Le facteur cytoplasmique S

Nous avons identifié, dans le cytoplasme des souches S, un élément responsable de la réaction d'incompatibilité, grâce à sa capacité de diffuser dans une hyphe s^S. La présence de ce facteur est toujours étroitement liée à celle des noyaux S. Rien ne permet d'affirmer que le facteur d'incompatibilité S est aussi responsable de l'inhibition du facteur s ; mais rien ne permet non plus de supposer qu'il y a deux facteurs distincts : aussi, pour la commodité de l'exposé, parlerons-nous du facteur cytoplasmique S pour désigner le ou les intermédiaires de l'action du gène S dans les divers aspects du phénomène de barrage. Ce terme désigne donc en fait l'état cytoplasmique correspondant au phénotype S.

3°) Mécanisme de la réversion d'une souche s^S

La comparaison du mode d'action des souches SR sur les souches s^S avec celui des diverses autres souches capables de provoquer les réversions, permet de penser que toutes ces souches agissent en induisant la formation du facteur s par la souche s^S avec une efficacité variable : faible dans le cas des souches SR, grande pour les autres.

C H A P I T R E V

INTERACTION DES FACTEURS CYTOPLASMIQUES S et s

Nous venons de reconnaître, sinon de définir parfaitement, les éléments cytoplasmiques responsables de l'incompatibilité entre souches S et s. Nous allons maintenant essayer de préciser le mécanisme de leur interaction.

La rencontre des deux facteurs n'aboutit pas toujours au même résultat. Dans une anastomose entre hyphes S et s, leur rencontre provoque rapidement la mort des cellules, mais nous avons vu également des cas de réaction différée, qui nous ont paru traduire un aspect quantitatif des caractères S et s. Dans un ascogone s fécondé par une microconidie S, la rencontre des facteurs provoque l'élimination du facteur s, mais dans un article mixte S + s traité par le chloramphénicol, c'est le facteur s seul qui subsiste. Autrement dit, quand la rencontre des facteurs cytoplasmiques n'est pas léthale, le résultat de leur interaction peut varier en fonction de leur quantité relative ou des conditions physiologiques.

Afin de grouper et de préciser ces indications, nous allons étudier d'une manière plus systématique l'interaction des facteurs S et s, en modifiant expérimentalement leur quantité relative et les conditions physiologiques des cellules confrontées.

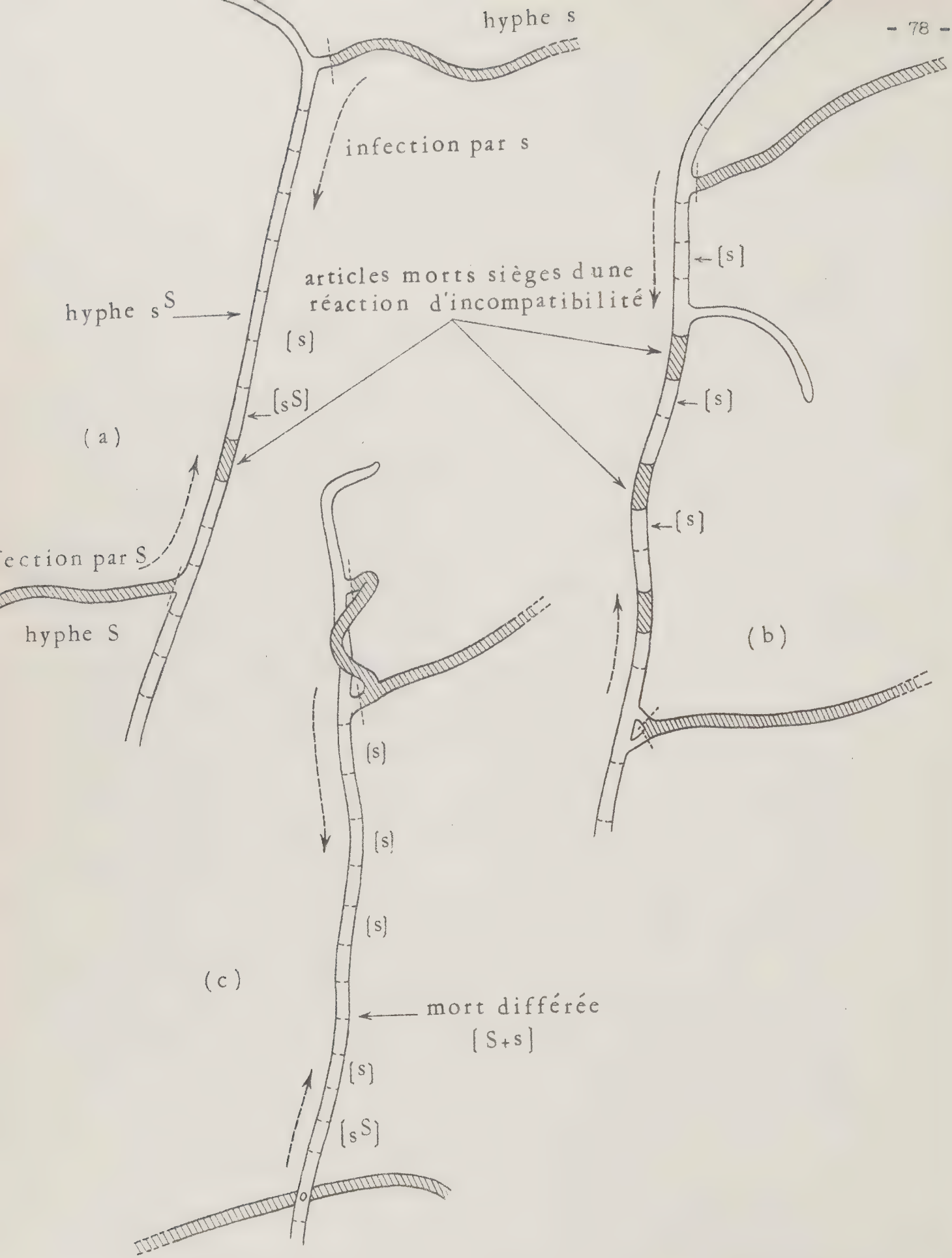


FIGURE 13 : Etude d'anastomoses doubles : S ... s^S ... s (Ampliation dans le texte)

I. INFLUENCE D'UNE DIFFERENCE QUANTITATIVE ENTRE LES DEUX FACTEURS SUR LE RESULTAT DE LEUR INTERACTION

1°) Réalisation expérimentale de cette différence

Une hyphe s^S, longue de quelques centaines de µ est anastomosée simultanément, à l'une de ses extrêmités avec une hyphe s et, à l'autre extrêmité, avec une hyphe S (Fig. 13). Le facteur S, ne se multipliant pas, a toutes les chances d'être plus rare que le facteur s, au moment de leur rencontre dans l'hyphe s^S.

2°) Résultats

Trois situations sont possibles, schématisées sur la figure 13.

a) Ou bien il se produit, en 1 seul point, une réaction de barrage (Fig. 13, a), comme si la réaction s'était produite au point de rencontre des deux "flux" S et s ;

b) ou bien on n'observe rien pendant plusieurs heures, puis la réaction se produit en 2 ou 3 points (Fig. 13, b), comme si les flux des deux facteurs s'étaient croisés sans se gêner et que la réaction ne s'était déclanchée que secondairement, de manière sporadique.;

c) ou bien aucune réaction ne se produit (Fig. 13, c).

Dans tous les cas, on peut isoler les articles vivants de l'hyphe s^S compris entre les 2 anastomoses, le faire repousser et tester leurs caractères. Les phénotypes observés dans 3 expériences particulières, correspondant aux trois situations décrites, sont indiqués sur la figure 13.

a) Sur la figure 13 a, le caractère s^S de l'article contigu à l'article mort est surprenant, car cet article a été traversé par le facteur s.

b) Sur la figure 13 b, entre les points de réaction, c'est le facteur s qui est "vainqueur".

c) Dans le cas schématisé en 13 c, où aucune réaction n'est visible, certains articles, isolés de l'hyphe s^S, meurent après une faible croissance, victimes à retardement d'une réaction d'incompatibilité.

3°) Discussion

La diversité des résultats obtenus dans ces expériences s'explique en partie par l'impossibilité d'obtenir des anastomoses s^S - S et s^S - s rigoureusement simultanées ; il est même généralement difficile de préciser laquelle des deux s'effectue la première. Malgré leur diversité, ces résultats permettent de dégager quelques conclusions, dont certaines nous sont déjà familières.

a) La réaction d'incompatibilité peut être différée.

Nous l'avions déjà vu en étudiant des anastomoses entre un article s physiologiquement anormal (article apical réduit, conidiophore) et une hyphe S. Nous avions supposé, alors, que l'article s ne contenait que peu de facteur s ; la réaction d'incompatibilité, qui ne se déclanchait qu'après la reprise de croissance de l'article, devait résulter d'une augmentation de la concentration du facteur s. Dans l'exemple schématisé sur la Figure 13 c, la situation est identique, et confirme notre interprétation.

b) La rencontre des facteurs n'est pas forcément léthale. L'étude d'anastomoses très rapprochées entre hyphes S et s (Chap. II, Fig. 3) nous l'avait déjà indiqué. La survie des articles S et s paraissait résulter de la fermeture rapide de la cloison d'anastomose qui avait empêché que chacun des articles ne reçût assez de facteur antagoniste pour mourir. Dans le cas représenté sur la

figure 13 b, les articles de l'hyphe s^S situés entre deux zones de réaction ont été le siège de la rencontre des deux facteurs et l'on peut conclure que leur survie et leur phénotype s résultent de la prédominance du facteur s et de l'élimination, sans dommage pour la cellule, du facteur S.

c) Lorsque la rencontre des facteurs n'est pas léthale, c'est le facteur s qui est "vainqueur", dans tous les cas, sauf un (Fig. 13, a). Le résultat est donc l'inverse de celui obtenu dans un croisement S x s. Mais il faut remarquer que, dans ces expériences, la situation est défavorable au facteur S dont la quantité est limitée dans l'hyphe s^S, puisqu'il n'y est pas synthétisé ; dans le zygote S/s au contraire, la présence des noyaux S en maintient la concentration.

Le cas représenté sur la figure 13 a révèle une autre situation : comme dans une hyphe s^S, la réversion ne progresse jamais de manière discontinue (Chap. III, p. 31), on ne peut comprendre que l'article contigu à l'article mort soit resté s^S, malgré le passage du facteur s, à moins de supposer que le facteur S s'y soit trouvé, par hasard, présent en quantité suffisante pour prévenir la propagation du facteur s.

<u>En résumé</u>, la comparaison de ces expériences avec des expériences précédemment décrites permet de conclure que la rencontre des facteurs cytoplasmiques S et s créé, dans une cellule, un état métastable qui peut évoluer soit vers la mort si les deux facteurs sont en quantité suffisante et équilibrée, soit vers l'élimination de l'un d'eux s'ils sont en quantité plus faible et inégale.

L'étude de la rencontre des facteurs dans d'autres conditions va nous permettre de confirmer et de préciser ces conclusions.

II. INFLUENCE D'UNE DIFFERENCE PHYSIOLOGIQUE ENTRE LES CELLULES CONFRONTEES

1°) Réalisation expérimentale de cette différence

Le principe de ces expériences est d'anastomoser une hyphe s ou S avec un article de la souche antagoniste. Cet article est soit un article normal isolé d'une hyphe, mais très court (10 - 15 µ) et qui devra donc subir quelques modifications physiologiques pour régénérer et s'anastomoser, soit un article déjà anormal : conidiophore ou article apical réduit (cf. Chapitre III, p. 51).

2°) Résultats

Le tableau XII groupe les résultats obtenus dont certains nous sont

TABLEAU XII

	Types d'articles	Types de réaction			
		normale	différée		supprimée
			2 à 20h	1 à 3j	
XII a : article s - hyphe S.	normaux	31	16	2	-
	apicaux réduits	9	3	2	-
	conidiophores	10	-	2	1
XII b : article S - hyphe s.	normaux	7	19	-	-
	apicaux réduits	3	4		3
	conidiophores	1	1	-	-

déjà connus (Chap. III, 2ème partie). Que l'article isolé soit s (Tabl. XII a) ou S (Tabl. XII b), trois types de résultats sont possibles.

a) Soit la réaction d'incompatibilité se produit normalement, comme entre deux hyphes.

b) Soit la réaction est différée. Cette situation s'observe plus fréquemment lorsque l'article isolé est S (24 cas sur 36) que lorsqu'il est s (25 cas sur 76). Le retard de la réaction va de 2 h à 24 h ou plus, mais la réaction se produit finalement après une légère croissance de l'article.

c) Soit la réaction n'a pas lieu du tout. Mais la situation est tout à fait différente suivant que l'article isolé est s ou S. Dans le cas de l'article s, la compatibilité résulte de la transformation $s \rightarrow s^S$ (cf. Chapitre III, p. 54). Dans les 3 cas d'anastomoses compatibles entre article S et hyphe s, la compatibilité s'accompagne d'une inhibition de la croissance de l'article S : l'isolement et le repiquage de ces articles mixtes compatibles donnèrent des cultures de phénotype s, ne renfermant que quelques rares noyaux S au centre.

3°) Discussion

Ces résultats apportent quelques précisions intéressantes.

a) Le retard d'une réaction d'incompatibilité peut varier d'une manière continue, qu'il soit dû à la déficience de l'une ou l'autre souche. Tout se passe comme si, dans certains cas, au début de l'anastomose, l'article s avait le phénotype s^S ou l'article S n'avait pas le phénotype S. La durée du retard de l'expression des phénotypes S ou s est proportionnelle au temps de latence qui précède la reprise de croissance de l'article. Les cas où la réaction d'incompatibilité ne se produit pas du tout sont précisément ceux où l'article régénère difficilement (après plus de 48 h pour l'article s) ou pas du tout (pour les articles S). Si l'expression différée du phénotype traduit la raréfaction de l'un des facteurs cytoplasmiques, on voit que l'augmentation de

la concentration des facteurs cytoplasmiques dépend de l'activité de la croissance. Ceci est tout-à-fait conforme aux résultats de l'étude de la propagation de la réversion (Chap. III, 1ère partie).

b) Il est beaucoup plus facile d'obtenir une réaction retardée par défaut de S que par défaut de s. Parmi les articles normaux isolés d'une hyphe S, 2 sur 3 environ présentent une réaction retardée ; d'autre part une réduction très limitée (2 ou 3 sections successives) des articles apicaux S entraîne à coup sûr un retard de la réaction, alors que les articles apicaux s les plus réduits sont souvent aussi réagissants qu'une hyphe entière. La distribution dans le cytoplasme du facteur S paraît donc plus irrégulière que celle du facteur s.

c) Lorsque la réaction d'incompatibilité ne se produit pas, par défaut de facteur cytoplasmique S, la présence du facteur s inhibe toute croissance de l'article S.

Ce résultat doit être rapproché de l'effet inhibiteur du chloramphenicol et de la ribonucléase sur la réaction d'incompatibilité (Chap. II, p. 24). On se rappelle, en effet, que des articles mixtes S + s, traités par ces produits, peuvent rester compatibles même après leur transfert dans un milieu nutritif ; mais lorsque la croissance reprend, les noyaux S ne se multiplient presque pas et sont éliminés. Le traitement au chloramphenicol ou à la ribonucléase de deux articles S et s pris dans les mêmes conditions a donc le même résultat que la confrontation d'un article S, plus ou moins dépourvu de facteur d'incompatibilité, avec un article s normal.

La comparaison des deux expériences permet d'interpréter l'action du chloramphenicol, dont on sait par ailleurs qu'il inhibe les synthèses de protéines. Lorsque les articles S et s s'anastomosent, si l'article S contient

suffisamment de facteur d'incompatibilité, la réaction se produit normalement, ce qui a lieu dans un cas sur 3 environ, proportion analogue à celles des articles S normaux présentant une réaction immédiate (Tabl. XII b). Au contraire, s'il n'y a pas assez de facteur S, sa synthèse se trouvant inhibée, les facteurs initialement présents sont dilués ou détruits et il n'en subsiste plus lorsque la croissance reprend. Le facteur s, lui, n'a pas disparu à ce moment, soit que sa synthèse n'ait pas été affectée, soit que sa durée de vie dans le cytoplasme soit plus grande ; lorsque la croissance reprend, sa présence inhibe non seulement la formation du facteur S mais aussi la multiplication des noyaux S.

Le même type d'interaction a été observé, avec d'autres gènes d'incompatibilité, chez le Podospora anserina. Dans plusieurs cas, le croisement entre deux souches faisant barrage donne des souches F_1 hétérocaryotiques réunissant les deux types nucléaires parentaux. Ces souches, dès le début de leur croissance, ne manifestent que l'un des phénotypes parentaux et celui des deux types nucléaires, toujours le même, dont l'expression est inhibée, est rapidement éliminé.

d) Les expériences que nous venons de décrire réalisent la rencontre des facteurs d'incompatibilité dans des cellules végétatives. Au cours des croisements S x s, la situation est un peu différente et paraît, à première vue, contradictoire avec celles-ci. En particulier, dans un croisement ♀s x ♂S, la présence de facteur s dans l'ascogone n'empêche pas la multiplication des noyaux S. Mais on peut supposer que la concentration du facteur s est faible dans l'ascogone et que, tout au long des divisions nucléaires conduisant aux nombreux couples de noyaux qui subissent la caryogamie, cette concentration n'augmente pas. Cette hypothèse est tout à fait compatible avec ce que l'on

sait par ailleurs de la raréfaction du facteur s dans les cellules où l'activité autocatalytique des noyaux est intense. Ce n'est qu'après la méiose, par exemple dans les cellules ascogènes, que les synthèses reprenant, les interactions entre les facteurs cytoplasmiques se produisent : le facteur S étant toujours rapidement reformé en présence de noyaux S, il sera généralement prédominant dans les asques et les facteurs s initialement présents mais dilués ne pourront se propager.

L'interaction des deux facteurs d'incompatibilité paraît donc pouvoir expliquer tous les aspects du phénomène de barrage entre les souches S et s.

III. CONCLUSIONS

1°) Interaction cytoplasmique des 2 facteurs

a) Dans une même cellule, la présence simultanée des facteurs cytoplasmiques S et s entraîne la mort, s'ils se trouvent en quantité suffisante et équilibrée.

b) Lorsque l'un des facteurs a une concentration plus faible que l'autre, deux situations sont possibles :

- Ou bien la réaction d'incompatibilité est différée et ne survient que lorsque la concentration du facteur déficient s'est accrue ; cet accroissement est lié à l'activité synthétique de la cellule ou à sa différenciation puisque : 1°) dans les cellules dont les noyaux ont une activité hétérocatalytique réduite (conidiophores, articles courts obligés à régénérer) les facteurs sont raréfiés ; 2°) l'accroissement de la concentration du facteur déficient est toujours consécutif à la reprise de la croissance de l'article

- Ou bien la réaction d'incompatibilité n'a pas lieu, parce que le taux du facteur déficient ne s'accroît pas (par exemple, le facteur S dans une hyphe s^S, ou le facteur s dans les asques issues du croisement ♀s x ♂S). Dans ce cas, le facteur prédominant élimine le facteur antagoniste.

2°) Interactions nucléo-cytoplasmiques

Le fait qu'un article mixte S + s, où l'un des deux facteurs d'incompatibilité est déficient, puisse demeurer compatible indique que le facteur prédominant bloque la synthèse de l'autre. Mais tandis que le blocage de la synthèse du facteur s est compatible avec l'activité normale d'une cellule de génotype s, le blocage de la synthèse du facteur S n'est pas compatible avec l'activité des noyaux S.

Ceci revient à dire qu'il existe, pour une cellule de génotype s, une voie métabolique de rechange, qui correspond à l'établissement du phénotype s^S, alors que, pour une cellule de génotype S, aucune alternative n'existe à la synthèse du facteur S.

D I S C U S S I O N E T C O N C L U S I O N S

Nous récapitulerons tout d'abord l'ensemble des données acquises sur le phénomène de barrage entre souches S et s du Podospora anserina.

Le barrage est la traduction macroscopique de réactions d'incompatibilité cellulaire : entre hyphes de souches donnant barrage, les anastomoses se forment normalement, mais sont létales. Cette incompatibilité résulte toujours d'une différence de génotype entre les souches confrontées ; dans le cas du barrage entre souches S et s, cette différence n'implique qu'un seul locus. A ce locus correspondent trois allèles : s, SR et SNR.

Les souches de génotype s sont de deux types : les unes (s) font barrage, les autres (s^S) ne font pas barrage avec les souches SR et SNR. Les souches s^S diffèrent des souches s par une modification cytoplasmique héréditaire et réversible.

La transformation $s \rightarrow s^S$ est régulièrement provoquée, sous l'action d'une souche S (SR ou SNR) au cours d'un croisement S x s. Mais les deux croisements réciproques n'ont pas une descendance identique : toutes les souches de génotype s issues des croisements ♀S x ♂s sont s^S, tandis que dans les croisements ♀s x ♂S, on trouve toujours quelques individus s parmi les descendants de génotype s.

Dans les croisements réciproques s x s^S, l'hérédité est strictement maternelle : la descendance est s ou s^S selon que la mère était s ou s^S.

Les souches s^S peuvent toutes revenir au phénotype s. Elles le font spontanément avec une fréquence de l'ordre de celle d'une mutation génique. La réversion, une fois apparue en un point, s'étend à toute la culture s^S. Cette transformation contagieuse est régulièrement provoquée par anastomoses entre une hyphe s^S et une hyphe s. La transformation débute au point d'anastomose et se propage, dans l'hyphe s^S, de manière continue. Cette propagation n'est accompagnée d'aucune migration de noyaux s. La réversion $s^S \rightarrow s$ peut également être provoquée par anastomose avec d'autres souches : soit des souches sauvages d'origines géographiques différentes, dont certaines possèdent le gène s, soit des souches qui ne possèdent pas ce gène, comme les souches SR. Dans ce dernier cas, une faible proportion seulement des contacts protoplasmiques sont efficaces.

Lorsque la réversion est déclanchée, de quelque manière que ce soit, la vitesse de sa propagation ne dépend que du génotype de la souche s^S et de sont activité métabolique.

Le phénotype s est parfaitement stable au cours de la croissance. Toutefois, dans certains cas, (filaments obtenus à partir de microconidies, conidiophores, articles apicaux réduits, cf. Chapitre III, p. 51) on observe toute une gamme de phénotypes intermédiaires entre s et s^S : lorsque ces hyphes ou articles sont anastomosés à une hyphe S, la réaction d'incompatibilité peut être plus ou moins différée. Dans des cas extrêmes, elle est supprimée : on obtient un phénotype s^S stable. La transformation $s \rightarrow s^S$ peut donc s'opérer directement à partir d'un élément de thalle s, sans passer par le croisement S x s. Nous avons appelé facteur cytoplasmique s, le constituant des souches s qui est responsable de l'incompatibilité avec le protoplasme S.

Le phénotype S peut ne pas se manifester si les éléments de thalle S étudiés sont très petits, par exemple des articles isolés, dont la croissance est temporairement ralentie ou arrêtée. Lorsque ces articles sont anastomosés à des hyphes s, on observe un retard dans l'apparition de la réaction d'incompatibilité, mais la réaction finit toujours par se produire dès que la croissance de l'article reprend. C'est seulement quand la croissance est impossible que la réaction est supprimée. Comme pour les souches s, il existe dans les souches S un facteur cytoplasmique responsable de la réaction d'incompatibilité : ce facteur peut migrer, indépendamment des noyaux S, dans une hyphe s^S, et lui conférer temporairement le phénotype S.

Les facteurs cytoplasmiques S et s exercent l'un sur l'autre une action inhibitrice. Lorsqu'il ne se produit pas de réaction d'incompatibilité entre éléments S ou s (en présence de chloramphenicol par exemple, ou au cours de la formation des asques issus des croisements S x s), on obtient un élément mixte où l'un des deux phénotypes seulement s'exprime ; tout se passe comme si l'un des facteurs inhibait la formation de l'autre. Quand le phénotype s cesse d'être exprimé, on obtient l'état cellulaire stable s^S, mais nous n'avons pas observé d'état stable correspondant à la suppression du phénotype S.

Ces résultats posent de nombreux problèmes dont certains : celui de la nature chimique des facteurs cytoplasmiques S et s ou celui de la physiologie de la réaction d'incompatibilité par exemple n'ont pu être abordés par les techniques utilisées. D'autre part, la possibilité d'obtenir des thalles anormaux et même des thalles normaux à partir d'éléments sexuels mâles (microconidies) presque dépourvus de cytoplasme soulève un problème biologique intéressant qui mériterait une analyse plus approfondie ; de même, la corrélation observée entre l'inhibition d'un phénotype et l'impossibilité pour les noyaux correspondants de se multiplier en pose un autre. Mais quel que soit

l'intérêt de ces problèmes, les données sont encore insuffisantes pour une discussion fructueuse.

Nous nous bornerons à discuter la nature des facteurs cytoplasmiques S et s et le mécanisme d'entretien des états cytoplasmiques s et s^S. Puis nous envisagerons la signification de nos résultats dans le cadre des phénomènes d'hérédité cytoplasmique et des phénomènes d'incompatibilité cellulaire.

I. NATURE DES FACTEURS CYTOPLASMIQUES S et s

L'existence d'un facteur cytoplasmique, qui évoque toujours, pour le généticien, une "particule" plus ou moins autonome, est habituellement déduite de l'observation d'une différence héréditaire à déterminisme extra-chromosomique entre deux lignées cellulaires. C'est le cas pour le facteur s, mais non pour le facteur S : on ne connait pas de phénotype S modifié et on ne peut obtenir de lignées cellulaires à phénotype non-S stable ; le facteur cytoplasmique S n'aurait jamais été identifié sans les particularités des anastomoses qui, chez le P. anserina, permettent des échanges cytoplasmiques sans migration nucléaire. Cependant, comme les facteurs cytoplasmiques S et s sont associés à des gènes allèles et interviennent de manière symétrique dans la réaction d'incompatibilité, on est amené à envisager la nature génétique du facteur cytoplasmique S.

L'observation de phénotype S à expression retardée paraît indiquer soit que le facteur est réparti de manière discontinue dans les hyphes S, soit que sa concentration y est variable. Mais ceci n'implique nullement qu'il soit une particule. Toutes ses propriétés sont celles d'un constituant cellulaire transitoire, dont le maintien est strictement dépendant de la présence du gène S

Il peut être considéré comme le produit d'activité de ce gène.

Le fait que les deux allèles SR et SNR produisent des facteurs cytoplasmiques ayant la même action sur les souches s mais une action différente sur les souches s^S permet de supposer que ces facteurs sont des molécules relativement complexes, puisqu'elles sont susceptibles d'une variation partielle de leur activité.

D'autre part, l'effet inhibiteur du chloramphénicol et de la ribonucléase sur la synthèse des facteurs cytoplasmiques SR et SNR suggère qu'ils pourraient être constitués par des protéines. Les résultats récemment obtenus par WILSON, GARNJOBST et TATUM (1961) rendent cette hypothèse très plausible. En effet, ces auteurs ont étudié, chez le Neurospora crassa, un phénomène d'incompatibilité identique au nôtre (cf. Chapitre II, p. 22) ; en injectant dans des hyphes de l'une des souches divers extraits de cytoplasme de la souche antagoniste, ils ont démontré la nature protéique des éléments responsables de l'incompatibilité.

Le facteur cytoplasmique s présente des propriétés différentes de celles du facteur cytoplasmique S : la stabilité des phénotypes s et s^S pourrait a priori s'expliquer en supposant que le facteur s est associé à une particule sub-cellulaire qui, dans les souches s^S, se trouverait absente ou inactive ; la réversion résulterait de la réapparition ou de la réactivation de la particule.

La transformation $s \rightarrow s^S$ pourrait résulter de l'inactivation d'une particule, régulièrement provoquée au cours des croisements S x s. D'autres exemples sont connus d'inactivation régulière d'une fonction cytoplasmique associée à une structure sub-cellulaire : par exemple, chez les Euglènes,

certains traitements induisent simultanément dans toutes les cellules, l'arrêt définitif de la synthèse des chlorophylles (DE DEKEN, 1960) ; chez la levure, le croisement entre une souche normale et une souche "petite suppressive" produit des descendants qui présentent tous la même déficience respiratoire que la souche "petite" (EPHRUSSI, HOTTINGUER et ROMAN, 1954). Si le cytoplasme s^S contenait des particules inactives, comme toute souche s^S peut réverser, il faudrait expliquer que la réactivation de ces particules soit toujours possible et contagieuse. On pourrait supposer par exemple, que la réversion résulte d'une compétition entre particules actives et inactives, comme on en observe entre différents types de particules Kappa (DIPPEL, 1950). Les facteurs cytoplasmiques poky (MITCHELL et MITCHELL, 1952) et mi-4, responsables de déficiences respiratoires chez le Neurospora, constituent un autre exemple de compétition entre "particules" : le mélange de deux types de facteurs dans un même protoplasme est instable et l'un des deux est éliminé au cours de la croissance (PITTENGUER, 1956).

La transformation $s^S \rightarrow s$ provoquée par le contact protoplasmique s - s pourrait aussi s'expliquer par la multiplication de particules apportées par la souche s. La transformation $s \rightarrow s^S$ correspondrait alors à la perte de ces particules. Mais le fait que la réversion $s^S \rightarrow s$ soit toujours possible spontanément implique alors que l'information nécessaire à la réapparition de la particule est conservée, lorsque la particule cytoplasmique est perdue. Les bactériophages tempérés et le virus σ de la Drosophile sont des exemples de particules génétiques susceptibles d'exister sous deux formes, l'une cytoplasmique et infectieuse, l'autre "intégrée" et inactive. Mais, dans le cas du système $s \rightleftharpoons s^S$, il faudrait admettre que, dans le protoplasme s, les particules libres et les particules intégrées coexistent, puisque les transformations $s \rightarrow s$

ou $s^S \rightarrow s$ laissent intactes la potentialité de transformations ultérieures ; la particule intégrée ne conférerait pas d'immunité contre les particules libres, à la différence de ce qui paraît se produire dans le cas des "épisomes" (JACOB et WOLLMAN, 1958).

Mais si toutes ces hypothèses sont plausibles, toutes sont basées sur l'existence de particules autoreproductibles et ne pourraient être étayées que par la preuve de la multiplication covariante du facteur cytoplasmique s. Il faudrait donc en connaître des "mutants", ce qui n'est possible que si on peut lui attribuer plus d'une propriété. En fait, nous n'avons pu identifier ce facteur que par la réaction d'incompatibilité. De très nombreuses souches s, naturelles ou issues de réversions spontanées indépendantes de souches s^S, n'ont jamais montré, par le détail de leur réaction d'incompatibilité, ou leur efficacité à provoquer la réversion d'une souche s^S ou la vitesse de propagation de la réversion qu'elles induisent, de différence que l'on pût relier au facteur s.

En l'absence de preuves de la continuité génétique du facteur cytoplasmique s, nous pouvons envisager d'autres hypothèses et admettre que le facteur s est un constituant cellulaire transitoire. L'hypothèse la plus simple est de le considérer comme le produit d'activité du gène s, de même que le facteur "allèle" S est le produit d'activité du gène S. Plusieurs faits viennent à l'appui de cette hypothèse. Tout d'abord, il existe une corrélation absolue entre la présence du gène s et la possibilité d'apparition du facteur s. Ensuite, il existe une relation entre la synthèse de ce facteur et l'activité hétérocatalytique des noyaux des souches s et s^S : la vitesse de la transformation $s^S \rightarrow s$, c'est-à-dire de propagation des facteurs cytoplasmiques s, est

fonction de l'activité métabolique de la souche s^S ; d'autre part, on observe, dans les conidiophores, toute une gamme de phénotypes s à expression retardée qui paraît traduire la raréfaction du facteur cytoplasmique s ; tout se passe comme si le taux de synthèse du facteur cytoplasmique décroissait lorsqu'il se produit une active multiplication nucléaire sans accroissement correspondant de la masse de cytoplasme. Enfin, l'étude de la réversion provoquée nous a montré qu'elle correspond à l'induction de la reprise d'une activité métabolique dans le protoplasme s^S, plutôt qu'à l'apport d'un facteur cytoplasmique susceptible de se multiplier, puisqu'une souche SR peut induire cette réversion dans les mêmes conditions qu'une souche s, quoiqu'avec une plus faible probabilité.

Mais si le facteur cytoplasmique s est le produit d'activité du gène s, le gène ne suffit pas à assurer le maintien du phénotype s. Il nous faut alors analyser les relations particulières du gène s avec le facteur cytoplasmique correspondant et comprendre comment sont entretenus les états cytoplasmiques s et s^S.

II. MECANISME D'ENTRETIEN DES ETATS STABLES s et s^S

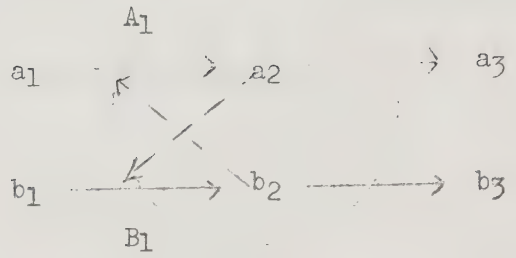
Il nous faut expliquer : 1) que le phénotype s puisse être ou ne pas être exprimé - 2) que son expression ou sa non-expression se maintiennent au cours de la croissance - 3) que des modifications physiologiques plus ou moins spécifiques inhibent ou permettent l'expression du phénotype s.

Ces trois particularités de notre système se retrouvent dans divers processus d'induction de synthèses enzymatiques et correspondent sans doute à des mécanismes généraux de régulation du fonctionnement cellulaire (cf. JACOB

et MONOD, 1961). Seul l'aspect génétique de ces mécanisme peut être envisagé dans le cas des phénotypes s et s^S. Si le facteur cytoplasmique s est le produit d'activité du gène s, à quel niveau se situe le blocage de l'expression du phénotype s ? Est-ce le gène dont l'activité se trouve inhibée dans une souche s^S ou est-ce un intermédiaire cytoplasmique de son action ?

Parmi les exemples connus d'alternance de deux ou plusieurs phénotypes, les mieux analysés sont sans doute les modifications du type antigénique chez les Paramécies (cf. BEALE, 1954) et les variations de phase chez les Salmonelles (LEDERBERG et IINO, 1956). Dans ces cas, comme dans le nôtre, un seul phénotype s'exprime à la fois parmi un nombre fixe de phénotypes potentiels, génétiquement déterminées ; le phénotype exprimé est héréditaire, mais dans certaines conditions (variation de température, contact cytoplasmique avec une cellule d'un autre phénotype, introduction du gènes différents) il peut être remplacé par l'un des autres phénotypes potentiels. D'autre part, le phénotype exprimé peut changer spontanément avec une probabilité faible, de l'ordre de celle d'une mutation génique.

Pour expliquer la stabilité de ces états cellulaires, on peut recourir au type d'interprétation dont la formulation générale a été donnée par DELBRUCK (1949) et récemment développée par SZILARD (1960). La figure 14 représente le schéma devenu classique d'un système cellulaire de steady states. L'équilibre résulterait d'interactions au niveau des chaînes métaboliques, le produit a2 étant susceptible d'inhiber la réaction catalysée par l'enzyme B_1 et le produit b2 celle catalysée par l'enzyme A_1 ; cette inhibition pourrait résulter d'un mécanisme de répréssion et le choix d'un état dépendrait alors des concentrations relatives d'enzymes et de répresseurs. On peut aussi supposer



FIFURE 14 : Schéma de DELBRÜCK

qu'il se produit une compétition pour un précurseur commun et que l'enzyme prédominant oriente les synthèses dans une voie au détriment des autres.

Dans le cadre de ce schéma, on peut envisager les conséquences de ces interactions au niveau des gènes. L'établissement d'un équilibre peut résulter : soit de l'inhibition, au niveau cytoplasmique, des produits d'activité des gènes, soit de l'inhibition de l'activité des gènes eux-mêmes. Dans le cas des types antigéniques des Paramécies, rien n'oblige à considérer que l'activité des gènes se trouve affectée ; le fait que l'équilibre soit très sensible à des modifications non spécifiques (température), qu'il puisse y avoir dans une cellule d'un type antigénique donné, de petites quantités d'autres antigènes, qu'il y ait un délai relativement long entre l'intervention de facteurs plus spécifiques (apport de protoplasme étranger, introduction de nouveaux gènes) et l'expression du nouveau phénotype, est tout à fait compatible avec l'idée que les interactions se produisent au niveau d'intermédiaires cytoplasmiques relativement stables.

Au contraire, dans le cas des Salmonelles, les interactions qui déterminent l'expression d'un phénotype au détriment de l'autre affectent

l'activité des gènes, du moins pour les allèles du locus H2. L'étude de la transduction des loci H1 et H2, contrôlant la spécificité des antigènes formés a montré, en effet, que les allèles H2 sont exprimés ou non exprimés dans le clone issu de la bactérie receveuse selon qu'ils l'étaient ou non dans la bactérie donneuse. Il paraît donc se produire une modification durable de l'activité de ces gènes.

Sans que l'on puisse préciser actuellement la nature de la modification qui entraîne le maintien de l'activité ou de la non-activité d'un gène, il semble bien que cette notion d'état actif ou inactif d'un gène puisse être considéré "comme un paramètre de variation génique indépendant des changements mutationnels de la spécificité" (LEDERBERG et IINO, 1956). Pour ce type possible de modifications héréditaire, LEDERBERG (1958) a proposé le qualificatif "d'épinucléique". Cette notion de changement épinucléique peut vraisemblablement servir de lien entre divers résultats d'ordre embryologique, cytologique, cytogénétique et génétique qui ont révélé l'existence de différenciations fonctionnelles des noyaux, indépendantes de toute modification de l'information nucléique : des expériences de transplantation nucléaire chez Rana pipiens ont montré que les capacités fonctionnelles de noyaux génétiquement identiques variaient au cours de l'embryogénèse (KING et BRIGGS, 1955) ; chez Rhynchosciara, on a mis en évidence une diversification morphologique des régions chromosomiques au cours du développement (PAVAN, 1958) ; chez le Mais, l'étude de certains "gènes instables" affectant la pigmentation des grains ont conduit Mc CLINTOCK (1956) à envisager l'intervention d'éléments "contrôleurs" dont la présence à un locus empêche l'expression phénotypique du gène qui s'y trouve et dont la "transposition" à un autre locus réactive ce gène (cf. également BRINK, 1958) ; enfin, la transformation $R^r \rightarrow R'$ étudiée par BRINK (1956, 1960) fournit sans

doute un autre exemple de modification fonctionnelle stable d'un gène, régulièrement provoquée au cours de la croissance des plantes hétérozygotes R^r/R^{st}, phénomène dont nous avons déjà souligné l'analogie avec la transformation $s \rightarrow s^S$ (cf. p. 3 et 54).

On peut interpréter le maintien des états s et s^S en faisant intervenir l'état du gène s ; il serait actif dans les souches s et inactif dans les souches s^S. Mais la situation est différente de celle qu'on observe dans le cas des Salmonelles : en effet, les microconidies formées par des souches s ou s^S transmettent, dans les croisements, des noyaux dont les propriétés fonctionnelles sont strictement identiques ; ce n'est pas le fait que le gène s était actif ou inactif dans la souche parentale mâle qui détermine l'expression ou la non-expression du phénotype s parmi les descendants de génotype s, mais c'est l'état cytoplasmique du parent femelle. Tout se passe comme si le gène s était "naturellement" inactif et ne pouvait être actif que dans des conditions cytoplasmiques définies.

Les conditions qui règlent l'activité du gène s sont les suivantes :

a) Dans une souche s^S, l'activité du gène est toujours induite au contact de protoplasme s ; elle l'est également au contact de diverses souches dont plusieurs possèdent le gène s et apportent donc vraisemblablement le facteur cytoplasmique s ou un précurseur de celui-ci. D'autre part, on peut raisonnablement supposer que, les facteurs cytoplasmiques S et s étant produits par des gènes allèles, sont de nature chimique voisine ; si le facteur SR est plus "analogue" du facteur s que le facteur SNR, on peut comprendre qu'il ait, avec une certaine probabilité, le même effet que le facteur s.

b) Inversement, la transformation $s \rightarrow s^S$ paraît résulter de la disparition

locale du facteur s. Lorsque celui-ci se raréfie (dans les conidiophores ou, après une fécondation, pendant les divisions qui donnent les nombreux couples de noyaux qui subiront la méiose) la probabilité qu'un petit élément (microconidie, spore) ait le phénotype s^S devient notable. Le rôle du gène S sans la transformation $s \rightarrow s^S$, au cours des croisements ♀s x ♂S, peut être envisagé de la manière suivante : nous avons vu que le facteur cytoplasmique S, lorsqu'il était prédominant, inhibait la propagation des facteurs cytoplasmiques s ; on peut alors supposer que les facteurs s initialement présents dans l'ascogone, ne se multipliant pas au cours des nombreuses divisions nucléaires, se trouvent absents dans la plupart des cellules ascogènes ; après la méiose, les facteurs S synthétisés par tous les noyaux S empêcheraient la propagation des rares facteurs s qui subsistent ; en conséquence la plupart des spores ne contiendraient pas de facteurs s et les gènes s se trouveraient ipso facto inactivés.

Le gène s peut donc être considéré comme un gène inductible qui n'est actif qu'en présence du produit de son activité, ou d'un précurseur ou analogue de celui-ci, et cesse de l'être dès que le facteur cytoplasmique est absent.

Cette interprétation du maintien des états stables s et s^S est compatible avec tous nos résultats. Rien n'infirme l'hypothèse selon laquelle le gène s étant toujours actif, ce serait un intermédiaire de son action qui se trouverait inactivé dans certaines conditions, entre autres en présence de cytoplasme S. Mais l'hypothèse d'une modification épinucléique du gène s nous paraît expliquer de manière plus simple et plus satisfaisante tous les faits et en particulier : la stabilité de l'état s^S, la distribution aléatoire des phénotypes s et s^S parmi les microconidies qui germent, la possibilité de réversion spontanée au sein d'un hétérocaryote S + s^S, la différence entre les

descendances des deux croisements réciproques S x s.

Les gènes SR et SNR ont des propriétés radicalement différentes de celles de leur allèle s : tout d'abord ils n'ont pas besoin d'inducteur cytoplasmique pour être actifs (ou bien, cet inducteur est toujours présent et ne peut être identifié) ; ensuite tout se passe comme si l'inhibition de leur activité était incompatible avec la survie des noyaux. Autrement dit, les gènes SR et SNR d'une part, s d'autre part ne diffèrent pas seulement par la nature de l'information structurale qu'ils contiennent, mais aussi par leur "état" d'activité. Dans le cas des gènes y et z responsables de la synthèse de la β-galactosidase et de la galactoside perméase d'E. coli, c'est un locus distinct, i, qui paraît régler l'activité des gènes y et z et ne transmet à lui seul aucune information relative à la structure des deux enzymes (cf. JACOB et MONOD, 1961). Dans le cas des gènes S et s, l'organisme ne se prête pas à une analyse fine de la région chromosomique intéressée. Mais, de même que pour le locus H2 des Salmonelles, rien n'indique l'existence d'un gène régulateur distinct des gènes de structure. L'état fonctionnel d'un gène pourrait bien être une propriété intrinsèque liée à quelque particularité de sa structure.

En résumé, des conditions cytoplasmiques spécifiques permettent ou inhibent l'activité des gènes S et s ; le résultat de ces interactions nucléo-cytoplasmiques dépend de l'aptitude particulière de chaque gène à être ou non durablement inactivé.

III. LA TRANSFORMATION $s \rightarrow s^S$, PHENOMENE D'HEREDITE CYTOPLASMIQUE

Nous avons été amené à interpréter l'hérédité cytoplasmique des caractères s et s^S comme le résultat des propriétés particulières du gène s et

des interactions entre ce gène et son produit d'activité : la présence du facteur cytoplasmique s est nécessaire au maintien de sa propre synthèse.

Si l'on admet cette interprétation, le facteur s joue, dans l'établissement du phénotype s, un rôle tout à fait comparable à celui de la galactoside perméase dans la synthèse de la β-galactosidase chez E. Coli (COHN et HORIBATA, 1959 a) ou à celui de la "particule" conférant la capacité de synthétiser la galactozymase, dans l'adaptation à long terme de la levure au galactose (SPIEGELMAN, 1951 ; cf. CAMPBELL, 1960). Dans ces deux cas, le caractère "auto-inductible" (COHN et HORIBATA, loc. cit.) ou "auto-catalytique" (SPIEGELMAN, loc. cit.) de la synthèse du produit cytoplasmique se définit de la manière suivante : 1) toute cellule qui possède une molécule d'enzyme ou une particule en formera d'autres ; 2) toute cellule qui n'en possède aucune n'en formera pas, sauf évènement cellulaire de faible probabilité. Ceci a pour conséquences que des cellules de génotype identique peuvent présenter deux phénotypes mutuellement exclusifs (cf. NOVICK et WIENER, 1957 ; COHN, 1958 : pour de faibles concentrations d'inducteur, dans une même population de bactéries, coexistent deux phénotypes mutuellement exclusifs, chaque cellule étant soit totalement induite soit non induite pour la synthèse de la β-galactosidase). Ces phénotypes sont stables et dans certains conditions transmissibles par hérédité cellulaire et peuvent se modifier de manière discontinue (COHN et HORIBATA, 1959 b). Il est clair que si l'on a affaire, non plus à des organismes unicellulaires mais à un thalle de champignon, un tel mécanisme entraîne, de plus, l'extrême stabilité de l'état induit et son caractère contagieux, comme c'est le cas pour l'état s du P. anserina.

Un certain nombre de cas d'hérédité cytoplasmique présentent les

mêmes particularités que celui que nous avons étudié. Par exemple, dans le phénomène étudié par SHARPE (1958), chez Aspergillus glaucus, le phénotype sauvage (mycélium jaune formant peu de conidies, appelé état B), se transforme avec une certaine fréquence en un phénotype modifié (mycélium gris-vert formant de très nombreuses conidies, appelé état A) qui apparaît comme une mutation sectoriale ; l'état A est infectant pour l'état B ; les conidies et les ascospores formées par un mycélium de phénotype A donnent, de manière aléatoire, des thalles de phénotype A ou B qui n'ont rien perdu de leur potentialité de subir de nouvelles transformations B → A ou A → B, dans les mêmes conditions que précédemment. Avec quelques variantes dans les conditions et la fréquence des transformations phénotypiques, on a observé chez d'autres champignons : Pestalozzia annulata (CHEVAUGEON, 1959), Curvularia pallescens (CUZIN, 1960), plusieurs champignons imparfaits (CHEVAUGEON, non publié), le même phénomène d'apparition et de maintien, au cours de la croissance, d'un état cytoplasmique exclusif d'un autre état toujours potentiel. Bien que, dans tous ces cas, on n'ait pas identifié de gène en relation avec la modification cytoplasmique, c'est un mécanisme d'interactions nucléocytoplasmiques comparable à celui que nous avons envisagé pour expliquer le maintien des états s et s^S, qui permet le plus aisément d'interpréter ces phénomènes. Si ces modifications cytoplasmiques infectantes se rencontrent surtout chez des champignons, c'est sans doute parce que la structure de leur thalle permet au phénotype contagieux de se manifester ; au contraire, ce type d'évènement ne peut être décelé, dans une population d'organismes unicellulaires ou dans des tissus de métazoaires, que si on le recherche par des techniques appropriées.

Si un mécanisme de synthèse auto-entretenue permet de rendre compte de

ces phénomènes d'hérédité cytoplasmique, on peut se demander si le cytoplasme ne joue pas surtout un rôle "épigénétique" (NANNEY, 1958 - 1960 ; EPHRUSSI, 1958) de contrôle et de régulation de l'activité des gènes et si des particules cytoplasmiques contenant une information génétique complexe interviennent couramment dans la différenciation et dans l'hérédité cellulaire.

On connait bien des particules cytoplasmiques autoreproductibles : les particules Kappa (cf. SONNEBORN, 1959), le virus σ de la Drosophile (cf. L'HERITIER, 1958), le facteur F des Bactéries (WOLLMAN et JACOB, 1958). Mais ces particules sont plutôt des virus établissant dans certaines conditions des relations extrêmement étroites avec leur hôte. Certes, ces relations sont si particulières qu'il devient impossible dans ces cas d'établir une distinction claire entre un virus et un constituant cellulaire normal. Cependant, le fait qu'il existe toujours un état cellulaire normal et stable qui ne contient la particule sous aucune de ses formes (bactérie F^-, mouche résistance au CO_2 etc...) ne permet pas de considérer ces éléments comme des exemples de particules autoreproductibles susceptibles de jouer un rôle dans la différenciation cellulaire "de tous les jours".

L'hypothèse de particules autoreproductibles, si elle permet une interprétation formelle de la plupart des phénomènes d'hérédité cytoplasmique est surtout requise pour ceux de ces phénomènes qui impliquent une transformation irréversible : par exemple, la transformation "grande" en "petite", chez la levure (EPHRUSSI et al., 1949) ou la perte de la capacité de synthétiser les chlorophylles, chez les Euglènes (DE DEKEN, 1960), ou les modifications irréversibles des chloroplastes induites sous l'influence du gène iojap et qui se maintiennent indépendamment de la présence ultérieure du gène (RHOADES, 1949). Dans aucun de ces cas pourtant on n'a pu démontrer l'intervention de particules

autoreproductibles. L'existence de "petites suppressives" chez la levure ne permet pas, d'ailleurs, de se contenter d'un simple modèle de particule perdue pour interpréter la transformation "grande" en "petite", puisque le caractère "suppressif" est contagieux pour une "grande" ; chez les Euglènes, il n'est pas certain que la perte définitive de la fonction chlorophylienne s'accompagn de la perte des chloroplastes.

Tout ce que l'on peut dire, c'est qu'il existe, dans les cellules, des produits métaboliques ou des structures "auto-indispensables" : un exemplaire (molécule ou particule) de ces éléments apparait indispensable à la formation d'autres éléments identiques. Un protoplaste bactérien ne paraît pouvoir reconstituer de membrane cellulaire que s'il en a conservé un petit fragment, de la même manière qu'une cellule qui a perdu ses chloroplastes ou tout un groupe d'enzymes respiratoires n'en reforme pas. Ceci n'implique pas nécessairement que la cellule ait subi une quelconque perte ou modification de son potentiel d'information génétique ; cela peut signifier seulement que les conditions cytoplasmiques d'expression de cette information ne sont plus réalisées, soit parce que la perte locale d'un type de molécule (ou d'un group de molécules liées à une structure) entraîne l'inactivation de certains gènes et l'activation corrélative d'autres gènes, soit parce qu'une structure cytoplasmique s'est perdue. On peut supposer que des molécules dont l'association constitue une structure soient incapables de s'organiser en structure en l'absence d'un modèle, ou inversement qu'une structure préexistante ordonne des réactions chimiques qui seraient, sans elle, livrées au hasard (cf. les discussions sur ce thème de DANIELLI, 1958 ; WEISS, 1958 ; HOTCHKISS, 1958). Des récents travaux de SONNEBORN et DIPPEL (1961) concrétisent cette manière d

voir : chez des Paramécies présentant des anomalies dans la structure de leur cortex (cellules à deux bouches, par exemple), l'anomalie structurale se reproduit identique à elle-même au cours des générations cellulaires, alors qu'il est bien évident d'une part qu'une Paramécie normale ne formera jamais cette duplication et d'autre part que cette partie de la cellule n'est pas "auto-reproductible". Ces faits peuvent fournir un modèle pour interpréter par exemple la reproduction de chloroplastes modifiés (cf. RHOADES loc. cit.) sans qu'il soit nécessaire d'attribuer à ceux-ci la capacité d'autoreproduction.

Il est certain que rien n'infirme l'existence de particules subcellulaires contenant leur propre information génétique, (c'est-à-dire une information aussi complexe que celle contenue dans une séquence de nucléotides), de même que rien ne démontre d'une manière définitive le schéma d'interprétation que nous avons proposé pour notre phénomène. Mais ce schéma a l'avantage d'expliquer à la fois la permanence d'un caractère et la possibilité de changement de ce caractère par le jeu d'un équilibre nucléocytoplasmique précis. L'interaction entre gènes et structures cytoplasmiques pourrait aussi rendre compte à la fois du maintien et de la possibilité de modification des structures et des fonctions cytoplasmiques.

IV. BARRAGE ET INCOMPATIBILITE CELLULAIRE

Si l'on considère non plus seulement le mécanisme des transformations $s \rightleftharpoons s^S$ mais aussi la nature du caractère étudié, nos résultats peuvent être envisagés dans le cadre plus général des phénomènes d'incompatibilité. On observe de tels phénomènes chez la plupart des organismes, où ils ont des

manifestations diverses : impossibilité de croisement ou histo-incompatibilité suivant que les interactions se produisent entre cellules sexuelles ou somatiques. Les phénomènes de barrage chez le P. anserina peuvent s'accompagner de ces deux types de manifestations : la situation réalisée par une anastomose entre deux hyphes incompatibles est comparable aux réactions d'histo-incompatibilité connues chez les animaux supérieurs ; dans certains cas, les gènes de barrages affectent la fertilité des croisements et deux souches donnant barrage peuvent être semi-incompatibles ou totalement incompatibles, comme le sont deux espèces différentes ou, au sein d'une même espèce, deux individus présentant des différences génétiques parfois très réduites.

Le barrage entre souches S et s constitue un exemple tout à fait schématique d'incompatibilité cellulaire : un seul couple de gènes détermine l'incompatibilité et le phénomène peut être analysé à l'échelle cellulaire. Ce barrage s'accompagne d'une fertilité normale des croisements S x s, grâce à la transformation $s \rightarrow s^S$. Cette situation a permis d'étudier le mode d'action des gènes d'incompatibilité.

1°) Il est clair que ce n'est pas la différence génique en elle-même qui est responsable de l'incompatibilité, mais les facteurs cytoplasmiques associés au fonctionnement des gènes S et s. L'incompatibilité disparait si la formation de l'un de ces facteurs est inhibée. D'autre part, le facteur cytoplasmique suffit à provoquer l'incompatibilité, en l'absence du gène correspondant : une hyphe s^S "infectée" par le facteur S est incompatible avec une hyphe s. Cette situation est comparable à celle observée chez certains Phanérogames, pour lesquels la compatibilité sexuelle est sous le contrôle des nombreux allèles S : on sait que la fécondation est impossible entre pollen et ovule de

génotype identique. Mais une plante hétérozygote : S1/S2 par exemple, produit des grains de pollen qui sont tous incapables de germer sur un style S2, même ceux qui portent l'allèle S1, parce qu'ils renferment le produit d'activité du gène S2, synthétisé par la plante hétérozygote avant l'isolement des grains de pollen.

2°) L'exemple de la transformation $s \rightarrow s^S$ montre que le gène d'incompatibilité peut ne pas se manifester. L'étude d'un autre cas de barrage chez le même organisme conduit à une conclusion analogue. Les souches s et A diffèrent par plusieurs couples de gènes : B1, C, d, e (souche s) et B2, c, D, E (souche A). Le barrage entre ces deux souches est dû d'une part à l'interaction des gènes allèles B1/B2, d'autre part à celle des gènes C/D ou C/E. Les gènes C et D n'étant pas allèles on obtient, dans la descendance des croisements s x A, des souches de génotype CD, qui réunissent donc les conditions d'une auto-incompatibilité. Or les spores de ce génotype germent et les thalles, qui poussent normalement pendant 28 heures environ, ne manifestent que le phénotype C. Mais ensuite, ils meurent, victimes d'auto-barrages se déclanchant simultanément dans presque tous les articles. Tout se passe donc comme si, pendant les premiers stades de la croissance, seul le gène C était actif, et que l'activité du gène D ne se déclanchait que plus tard (BERNET, non publié).

L'expression du gène D n'apparait donc qu'à un stade précis de la différenciation du thalle. Ce phénomène peut être rapproché de ce que l'on observe, chez les animaux supérieurs : la tolérance immunologique, provoquée par greffe de tissus homologues, ne peut être induite que jusqu'à un certain stade du développement, qui, suivant les espèces, se situe avant ou après la naissance (cf. BILLINGHAM, 1958). Ce stade peut être considéré comme le moment

après lequel les systèmes formateurs d'anti-corps se trouvent différenciés. Le fait qu'un organisme soumis, à un stade précoce de sa différenciation, à l'action d'antigènes auxquels il est potentiellement sensible de par son génotype, puisse devenir tolérant à ces antigènes, n'est pas sans analogie avec la transformation $s \rightarrow s^S$ provoquée au cours des croisements S x s. Si la tolérance "represents a specific central failure of the immunological response mechanism, i.e. the out come of some kind of induced functionnal change in the immunologically competent cell" (BILLINGHAM, loc. cit.), on peut supposer qu'elle résulte de quelque sorte de modification "épinucléique" sous l'influence de modifications cytoplasmiques intervenant avant la différenciation fonctionnelle du système formateur d'anti-corps. Cette supposition, tirée de la comparaison avec la transformation $s \rightarrow s^S$, n'est pas incompatible avec la théorie proposée par BURNET (BURNET, 1957 ; cf. LEDERBERG, 1958) : suivant cet auteur, il se produirait, au début du développement, une "randomization" ou hypermutabilité des gènes formateurs d'anti-corps, survie d'une stabilisation de l'état nucléique ; ceci conduirait à l'apparition d'un large éventail de spécificités distinctes. Il n'est pas interdit de penser que l'état cytoplasmique puisse influencer ou orienter cette stabilisation.

3°) L'étude de l'interaction entre les facteurs cytoplasmiques S et s nous a montré que l'expression des gènes S et s peut se trouver inhibée en présence du facteur cytoplasmique associé au gène antagoniste. Mais si le gène s peut être durablement actif ou inactif, le gène S ne peut être qu'actif : quand le phénotype S ne peut s'exprimer, les noyaux S ne peuvent pas de multiplier, et nous avons vu que le même phénomène s'observe dans d'autres cas de barrage (cf. Chapitre V, p. 85). Le gène D constitue une troisième catégorie d

gènes d'incompatibilité : son expression peut être temporairement interrompue.

Suivant le type de gènes en présence, on conçoit qu'entre souches génotypiquement incompatibles, les croisements puissent être complètement stériles (par exemple si les deux gènes sont du type S), soit complètement fertiles (si l'un des gènes est du type s), soit semi-incompatibles (si l'un des gènes est du type D). De la même manière, si le croisement est stérile, la stérilité peut être déterminée à des stades divers, entre le moment de la fécondation et celui de la germination des spores, suivant le moment où apparait l'expression de l'un ou des deux gènes d'incompatibilité. Chez les végétaux supérieurs également, la réaction d'incompatibilité peut se situer soit au moment de la germination du pollen sur le stigma, soit au cours de la croissance du tube pollinique, soit après la caryogamie.

Dans cette perspective, il est clair que si le gène D du Podospora, au lieu de se manifester tardivement, pouvait être durablement inactivé comme le gène s, les souches CD, malgré leur constitution génétique, seraient normales et l'auto-barrage ne se manifesterait au cours de la croissance qu'avec une faible probabilité, comme se produisent des réversions spontanées dans une culture s^S.

L'existence de génotypes potentiellement incompatibles mais normalement viables n'est pas une simple hypothèse : chez le Pestalozzia annulata, un barrage se manifeste entre cellules d'âges différents d'un même thalle homocaryotique (CHEVAUGEON et NGUYEN VAN HUONG, 1961) ; l'incompatibilité paraît résulter dans ce cas de la divergence de fonctionnement de cellules génotypiquement identiques.

L'apparition d'une réaction d'auto-incompatibilité dans un organisme (phénomène dont l'affection connue chez l'homme sous le nom de lupus érythémateux

paraît constituer un autre exemple) peut donc résulter de l'activation fortuite d'un gène.

Il est certain qu'on ne saurait expliquer tous les aspects de l'incompatibilité cellulaire à partir du simple schéma proposé pour le mécanisme génétique du barrage entre souches S et s. Mais il est probable que l'étude physiologique et biochimique de l'incompatibilité entre souches S et s serait de nature à apporter des éléments pour la compréhension de ce phénomène biologique très général.

R E S U M E

Les recherches qui font l'objet de ce mémoire portent sur un phénomène d'hérédité cytoplasmique mis en évidence chez le Champignon ascycomète Podospora anserina :

Entre les souches ne différant que par les gènes allèles S et s, on observe un barrage. Dans la descendance des croisements S x s, les souches de génotype s présentent un phénotype nouveau, s^S, différent de celui de la souche s parentale : elles ne font pas barrage avec les souches S. La transformation s $\rightarrow$ s^S résulte d'une modification cytoplasmique héréditaire et réversible (RIZET, 1952).

Nous avons cherché à préciser la signification, au niveau cellulaire, du phénomène de barrage ; nous avons analysé le mécanisme des transformations $s \rightarrow s^S$ et $s^S \rightarrow s$ au cours de la multiplication végétative et des croisements ; nous avons étudié, au niveau cellulaire, les conditions d'expression des phénotypes S et s et les interactions entre les trois types de souches : S, s et s^S.

Les principaux résultats obtenus sont les suivants :

1°) Le barrage est la traduction macroscopique de réactions d'incompatibilité cellulaire ; entre hyphes de deux souches donnant barrage, les anastomoses se forment normalement mais le mélange des protoplasmes est létal. Le phénotype S (ou s) d'une hyphe se définit par la réaction d'incompatibilité qui se déclanche dès que cette hyphe est anastomosée à une hyphe s (ou S).

2°) Les phénotypes S et s peuvent présenter, au niveau cellulaire, des

discontinuités. Dans certains cas, de très petits éléments de thalle (article isolés) anastomosés à une hyphe de la souche antagoniste, ne manifestent pas leur phénotype : (a) la réaction d'incompatibilité peut être notablement différée et n'apparaitre que lorsque l'article a repris sa croissance ; (b) dans des cas extrêmes, la compatibilité est durable et un seul des deux phénotypes s'exprime au cours de la croissance de l'élément mixte.

3°) La non-expression du phénotype s peut être durable et correspond à l'établissement de l'état cellulaire héréditaire s^S. Au contraire, si le phénotype S ne peut s'exprimer, les noyaux S ne peuvent plus se multiplier et on n'a jamais obtenu de lignées cellulaires génotypiquement S et ne manifestant pas le phénotype correspondant.

4°) L'expression du phénotype S dépend de la présence d'un facteur cytoplasmique, le facteur d'incompatibilité S, qui peut diffuser et réagir dans un protoplasme s^S ne contenant pas de noyaux S. Les propriétés du facteur cytoplasmique S sont celles d'un élément cellulaire transitoire dont la formation est strictement dépendante de la présence du gène S.

5°) L'expression du phénotype s dépend également de la présence d'un facteur cytoplasmique, le facteur d'incompatibilité s. L'analyse des conditions de disparition du phénotype s (au cours des croisements réciproques ♀S x ♂s et ♀s x ♂S ou de la formation des microconidies d'une souche s) indique que la transformation $s \rightarrow s^S$ paraît résulter directement de la perte du facteur cytoplasmique s. La transformation $s^S \rightarrow s$, toujours possible spontanément avec une probabilité faible, s'opère dès qu'on réintroduit le facteur cytoplasmique s dans le cytoplasme s^S (en particulier par suite d'un contact protoplasmique avec une souche s).

6°) Bien que la détermination du phénotype stable s ou s^S paraisse ne dépendre que de la présence ou de l'absence du facteur cytoplasmique s, celui-ci n'est pas indépendant du gène s. Le gène s est nécessaire à la synthèse du facteur s, et le taux de cette synthèse, mesuré par toute une gamme de phénotypes : phénotype s normal, phénotypes s à expression retardée, phénotype s^S, dépend de l'activité hétérocatalytique des noyaux s.

L'ensemble de ces résultats nous a conduit aux conclusions suivantes :

1°) Les facteurs cytoplasmiques S et s sont les produits d'activité respectifs des gènes allèles S et s.

2°) Des conditions cytoplasmiques définies permettent ou inhibent l'activité des gènes S et s. Nous avons reconnu trois sortes d'interactions nucléocytoplasmiques : 1) l'interaction : cytoplasme s/noyaux S, qui inhibe la synthèse du facteur cytoplasmique S et la multiplication des noyaux S ; 2) l'interaction : cytoplasme S/noyaux s, qui inhibe la synthèse du facteur cytoplasmique s mais non la multiplication des noyaux s ; 3) l'interaction : facteur s/gène s, qui se traduit par le fait que l'expression phénotypique du gène ne se maintient que par continuité cytoplasmique.

3°) Ce troisième type d'interaction conduit à attribuer les propriétés suivantes au gène s : il pourrait se maintenir sous deux états stables, actif ou inactif ; il ne serait actif qu'en présence de son produit d'activité et serait automatiquement inactivé en son absence. L'hérédité cytoplasmique du caractère s peut donc être considérée comme la conséquence du mode de fonctionnement du gène s.

4°) La comparaison des propriétés du gène s avec celles de son allèle S, qui ne peut être durablement inactivé, indique que ces deux allèles ne diffèrent pas seulement par la nature de l'information structurale qu'ils contiennent mais aussi par leur "état fonctionnel", qui peut être considéré comme un élément de l'information génétique.

La notion d'état fonctionnel d'un gène (notion déjà envisagée par quelques auteurs à propos d'autres phénomènes), état stable mais susceptible d'être modifié par les conditions cytoplasmiques, peut fournir un modèle pour interpréter certains aspects des phénomènes d'incompatibilité cellulaire chez les organismes supérieurs ; cette notion peut également aider à interpréter certains phénomènes de différenciation cellulaire.

B I B L I O G R A P H I E

AMES L.M. 1934 Hermaphroditism involving self sterility and cross fertility in the Ascomycete Pleurage anserina. Mycologia, 25, p.43.

BACHMANN B.J. et BONNER D.M. 1959 Protoplasts from Neurospora crassa. J. Bacteriol., 78, p.550.

BEALE G.H. 1952 Antigen variation in P. aurelia variety 1. Genetics, 37, p.62.

" 1954 The genetics of Paramecium. Cambridge University Press.

BERNET J., ESSER K., MARCOU D., SCHECROUN J. 1960 Sur la structure génétique de l'espèce Podospora anserina et sur l'intérêt de cette structure pour certaines recherches de génétique. Comptes rendus, 250, p.2053.

BILLINGHAM R.E. 1958 Actively acquired tolerance and its role in development. The chemical basis of development, ed. The John Hopkins Press, Baltimore, p.575.

BRINK R.A. 1956 A genetic change associated with the R locus in maïze which is directed and potentially reversible. Genetics, 41, n°6, p.872.

" 1958 Mutable loci and development. J. of Cell. and Compar. Physiol., 52 sup. 1, p.169.

" 1960 Paramutation and chromosome organisation. Quart. Rev. of Biol., 35, p.120.

BROCK R.D. 1961 Chloramphenicol. Bact. Reviews, 25, p.32.

BULLER A.H.R. 1933 Researches on fungi. V, 1° partie, ed. Hafner Publishing Co, New-York.

BURNET F.M. 1957 A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. Austral. J. Sc., 20, p.67.

CAMPBELL A. 1960 Autocatalytic particules and steady states. Nature, 186, p.256.

CHEVAUGEON J. et LEFORT C. 1960 Sur l'apparition régulière d'un "mutant" infectant chez un Champignon du genre Pestalozzia. Comptes rendus, 250, p.2247.

" et NGUYEN VAN HUONG 1961 L'auto-incompatibilité, conséquence régulière de la différenciation chez le Pestalozzia annulata. Comptes Rendus, 252, p.4183.

COHN M. 1958 On the differenciation of a population of Escherichia coli with respect to β-galactosidase formation. Dans The Chemical basis of development, ed. The John Hopkins Press, Baltimore, p.458.

" et HORIBATA K. 1959 a Inhibition by glucose of the induced synthesis of the β-galactoside enzyme system of E. Coli. Analysis of maintenance. J. of Bacteriol., 78, p. 601

" " 1959 b Analysis of the differenciation and of the heterogeneity within a population of E. Coli undergoing induced β-galactosidase synthesis. J. Bacteriol., 78, p.613.

CUZIN F. 1961 Apparition régulière chez Curvularia pallescens d'une variation sectorielle contagieuse, non transmissible par les thallospores. Comptes Rendus, 252, p.1656.

DANIELLI J.F. 1959 Some theoretical aspects of nucleocytoplasmic relationships. Experimental Cell Research, sup. 6, p.252.

DE DEKEN-GRENSON M. 1960 Le mécanisme de la perte héréditaire d'une fonction biochimique : la synthèse des chlorophylles. Arch. de Biol., LXXI n°3, p.371.

DE FONBRUNE P. 1949 Technique de micromanipulation. Ed. Masson, Paris.

DELBRUCK M. 1949 Dans "Unités biologiques douées de continuité génétique", Colloques internationaux du C.N.R.S., Paris, 7, p.33.

DIPPEL R. 1950 Mutation of the Killer cytoplasmic factor in P. aurelia. Heredity, 4, p.165.

EPHRUSSI B. 1953 Nucleocytoplasmic relations in microorganisms. Ed. Clarendon Press, Oxford.

" 1958 The cytoplasm and somatic cell variation. J. of Cell. and Compar. Physiol., 52, sup. 1, p.25.

" HOTTINGUER H., CHIMENES A.M. 1949 Action de l'acriflavine sur les levures. I- La mutation "petite colonie". Ann. Inst. Pasteur, 76, p.419.

" " TAVLITZKI J. 1949 Id. II- Analyse génétique du mutant "petite colonie". Ann. Inst. Pasteur. 76, p.419.

" MARGERIE - HOTTINGUER H., ROMAN H. 1955 Suppressiveness : a new factor in the genetic determinism of the synthesis of respiratory enzymes in Yeast. Proc. Nat. Ac. Sci., Wash., 41, p.1065.

ESSER K. 1954 Sur le déterminisme génétique d'un nouveau type d'incompatibilité chez Podospora. Comptes Rendus, 238, p.1731.

" 1959 Die incompatibilitätsbeziehungen Zwischen geographischen Rassen von Podospora anserina. Zeitschrift für Vererbungslehre, 90, p.29.

GARNJOBST L. et WILSON J.W. 1956 Heterocaryosis and protoplasmic incompatibility in Neurospora crassa. Proc. Nat. Ac. Sci., Wash., 42, p.613.

HOTCHKISS R.D. 1958 Commentaires dans la discussion "Molecular basis of the cause and expression of somatic cell variation". J. of Cell. and Compar Physiol., 52 sup. 1, p.331.

ICONOMIDIS J. et L'HERITIER Ph. 1960 Les relations du virus avec son hôte Drosophile. Etude de la perte spontanée de l'état stabilisé. Ann. de Génétique, 2, p.63.

JACOB F. et MONOD J. 1961 Genetic regulatory mechanism in the synthesis of protei J. Mol. Biol., 3, p.318.

" et WOLLMAN E.L. 1958 Les épisomes, éléments génétiques ajoutés. Comptes Rendus, 247, p.154.

KING T.J. et BRIGGS R. 1955 Changes in the nuclei of differentiating gastrula cells as demonstrated by nuclear transplantation. Proc. Nat. Ac. Sci., Wash., 41, p.321.

LEDERBERG J. 1958 Genetic approaches to somatic cell variation : summary comment. J. of Cell. and Comp. Physiol., 52 sup. 1, p.383.

" et LEDERBERG E.M. 1956 Infection and heredity, dans "Cellular mechanisms in differenciation and growth". Ed. Princeton University Press, Princeton, p.101.

" et IINO T. 1956 Phase variation in Salmonella. Genetics, 41, p.713.

L'HERITIER Ph. 1958 The hereditary virus of Drosophila. Adv. in Virus Res. 5, p.1

MAC CLINTOCK B. 1956 Controlling elements and the gene. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. XXI, p.197.

MITCHELL M.B. et MITCHELL H.K. 1952 A case of maternal inheritance in Neurospora crassa. Proc. Nat. Ac. Sci., Wash., 38, p.442.

MARCOU D. 1957 Rajeunissement et arrêt de croissance chez P. anserina. Comptes Rendus, 244, p.661.

MARCOU D. 1962 Thèse Sciences, sous presse.

" et SCHECROUN J. 1959 La sénescence chez Podospora anserina pourrait être due à des particules cytoplasmiques infectantes. Comptes Rendus, 248, p.280.

MONNOT F. 1953 Sur la possibilité de réaliser des croisements réciproques chez l'Ascomycète P. anserina. Comptes Rendus, 236, p.2263.

NANNEY D.L. 1958 Epigenetic factors affecting the mating type expression in certain ciliates. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. XXIII, p.327.

" 1960 Microbiology, developmental genetics and evolution. The Amer. Nat., XCIV, p.167.

NOVICK A. et WIENER M. 1957 Enzyme induction, an all or none phenomenon. Proc. Nat. Ac. Sci., Wash., 43, p.553.

PAPAZIAN H.P. 1950 Physiology of the incompatibility factors in Schyzophyllum commune. Botanical gazette, 112 n°2, p.143.

PAVAN C. 1958 Morphological and physiological aspects of chromosomal activities. Proc. 10th Int. Cong. of Genetics, Montreal, 1, p.321.

PITTENGER T.H. 1956 Synergism of two cytoplasmically inherited mutants in Neurospora crassa. Proc. Nat. Ac. Sci., Wash., 42, p.747.

RHOADES M.M. 1949 Les plastes. Dans "Unités biologiques douées de continuité génétique", Colloques Internationaux du C.N.R.S., Paris, 7, p.37.

RIZET G. 1943 Recherches sur la Génétique des Ascomycètes. Etude expérimentale du Podospora anserina. Thèse Sciences, Paris.

" 1952 Les phénomènes de barrage chez Podospora anserina. I : Analyse génétique des barrages entre souches S et s. Rev. Cytol. et Biol. Veg., XIII, p.51.

RIZET G. 1953 Sur la multiplicité des mécanismes génétiques conduisant à des barrages chez P. anserina. Comptes Rendus, 237, p.666.

" 1953 Sur l'impossibilité d'obtenir la multiplication végétative ininterrompue et illimitée de l'Ascomycète Podospora anserina. Comptes Rendus, 237, p.838.

" et ENGELMANN C. 1949 Contribution à l'étude génétique d'un Ascomycète tetrasporé : Podospora anserina (Ces) Rehm. Rev. Cytol. et Biol. Veg., XI, p.201.

" et ESSER K. 1953 Sur les phénomènes d'incompatibilité entre souches d'origine différente chez P. anserina. Comptes Rendus, 237, p.760

" MARCOU D. et SCHECROUN J. 1958 Deux phénomènes d'hérédité cytoplasmique chez l'Ascomycète P. anserina. Bul. Soc. Fr. Physiol. Veg., 4 n°4 p.136.

" et SCHECROUN J. 1959 Sur les facteurs cytoplasmiques associés au couple de gènes S-s chez le Podospora anserina. Comptes Rendus, 249, p.2392.

SCHECROUN J. 1958 Sur la réversion provoquée des souches s^S en souches s chez Podospora anserina. Comptes Rendus, 246, p.1268.

" 1959 Sur la nature de la différence cytoplasmique entre souches s et s^S de Podospora anserina. Comptes Rendus, 238, p.1394.

SHARPE H.S. 1958 A closed system of cytoplasmic variation in Aspergillus glaucus. Proc. Roy. Soc. B., 148, p.355.

SONNEBORN T.M. 1946 Experimental control of the concentration of cytoplasmic genetic factor in Paramecium. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol 11, p.236.

SONNEBORN T.M. 1959 Kappa and related particles in Paramecium. Adv. in Virus Res., VI, p.229.

" et DIPPELL R. 1961 The modes of replication of cortical organisation in P. aurelia syn. 4. Genetics, 46 n°8, p.899.

" et DIPPELL R. 1961 Self reproducing differencies in the cortical organisation in P. aurelia. Ibid., p.900.

SPIEGELMAN S. 1951 The particulate transmission of enzyme forming capacity in Yeast. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., XVI, p.87.

SZILARD L. 1960 The control of the formation of specific proteins in bacteria and in animal cells. Proc. Nat. Ac. Sci., Wash., 46, p.277.

TAVLITZKI J. 1954 Sur la croissance de Podospora anserina en milieu synthétique. Comptes Rendus, 238, p.2341.

VANDENDRIES R. 1932 La tetrapolarité sexuelle de Pleurotus columbinus. Démonstration photographique d'un tableau de croisement. La Cellule, 41, p.267.

WESTERGAARD M. et MITCHELL H.K. 1947 A synthetic medium favoring sexual reproduction. Amer. J. Botany., 34, p.573.

WEISS P. 1958 Summation and elevation, dans The chemical basis of development, ed. The John Hopkins Press, Baltimore, p.843.

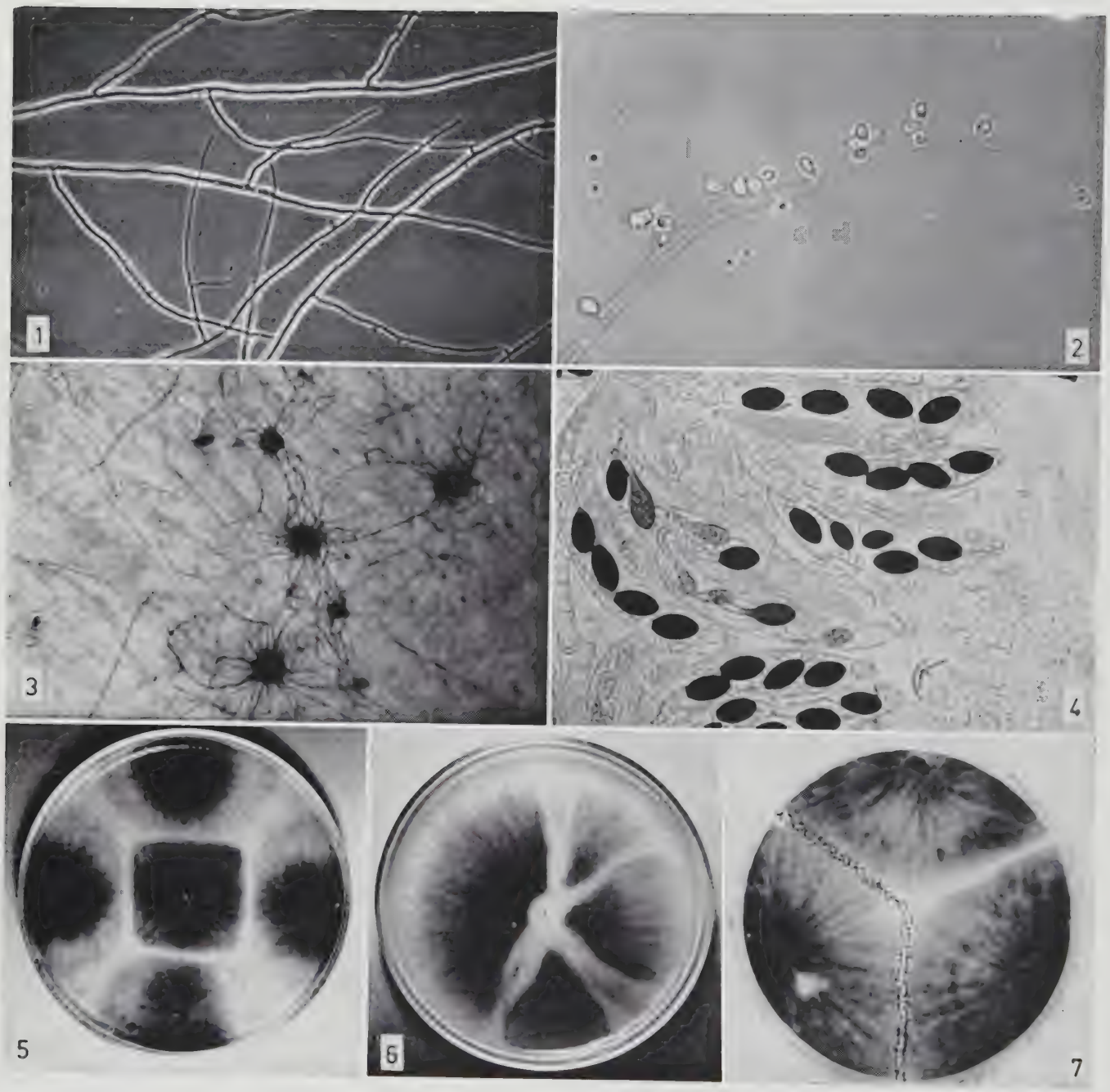
WILSON J.F. 1961 Micrurgial techniques for Neurospora. Amer. J. Botany, 48, n°1, p.46.

" GARNJOBST L., TATUM E.L. 1961 Heterocaryon incompatibility in Neurospora crassa : micro-injections studies. Amer. J. Botany, 48, p.299.

WOLLMAN E. et JACOB F. 1958 Sur le déterminisme génétique des types sexuels chez E. Coli K12. Comptes Rendus, 247, p.536.

ZALOKAR M. 1959 Enzyme activity and cell differenciation in Neurospora. Amer. J. Botany, 46, p.555.

" " Growth and differenciation of Neurospora hyphae. Ibid., p.603.



PI ANCHE I

PLANCHE I

- 1 - Réseau d'hyphes en goutte pendante (x 320).

- 2 - Hyphe conidiophore (x 1050).

- 3 - Protopérithèces à la surface d'une culture sur milieu gélosé (x 40).

- 4 - Paquet d'asques étalé, montrant des asques normaux à 4 ascospores et un asqueanormal à 2 ascospores uninucléés et 3 binucléés (x 160).

- 5 - Aspect macroscopique d'un barrage. La culture centrale fait barrage avec les 4 cultures périphériques ; entre celles-ci le contact est normal. (Boîte de Pétri : Ø : 10 cm).

- 6 - Aspect d'une culture issue d'un mélange d'hyphes S et s.

- 7 - Répartition des fructifications dans une confrontation fertile, dans le cas d'un barrage (entre les 2 cultures du bas) et dans le cas d'un contact normal (entre la culture supérieure et celle de gauche).

PLANCHE II

1 - 8 Phases successives de la réaction d'incompatibilité entre hyphes de deux souches donnant barrage.

- 1 - Les hyphes sont rapprochés (x 1280).

- 2 - Le contact protoplasmique est réalisé (x 1280).

- 3 et 4 - Premiers symptômes de réaction : noter l'épaississement de la cloison d'anastomose qui s'est fermée et l'aspect convexe des cloisons qui limitent les deux articles anastomosés ; un cal obture ces deux cloisons Le cytoplasme devient granuleux (3 : x 1280 ; 4 : x 1050).

- 5 - Sur l'hyphe de gauche de grosses vacuoles apparaissent où s'agitent des granules ; sur l'hyphe de droite la réaction a gagné un 2ème article et le protoplasme du 1er article atteint a coagulé (x 1050).

- 6 - Les articles contigus aux articles atteints par la réaction régénèrent à l'intérieur de la zone coagulée (x 1050).

- 7 - Exemple de régénération à l'extérieur de l'article mort (x 1050).

- 8 - Anastomose âgée de 20h environ. On peut voir 4 contacts létaux successi entre les 2 articles et leurs régénérations internes ou externes (1050)

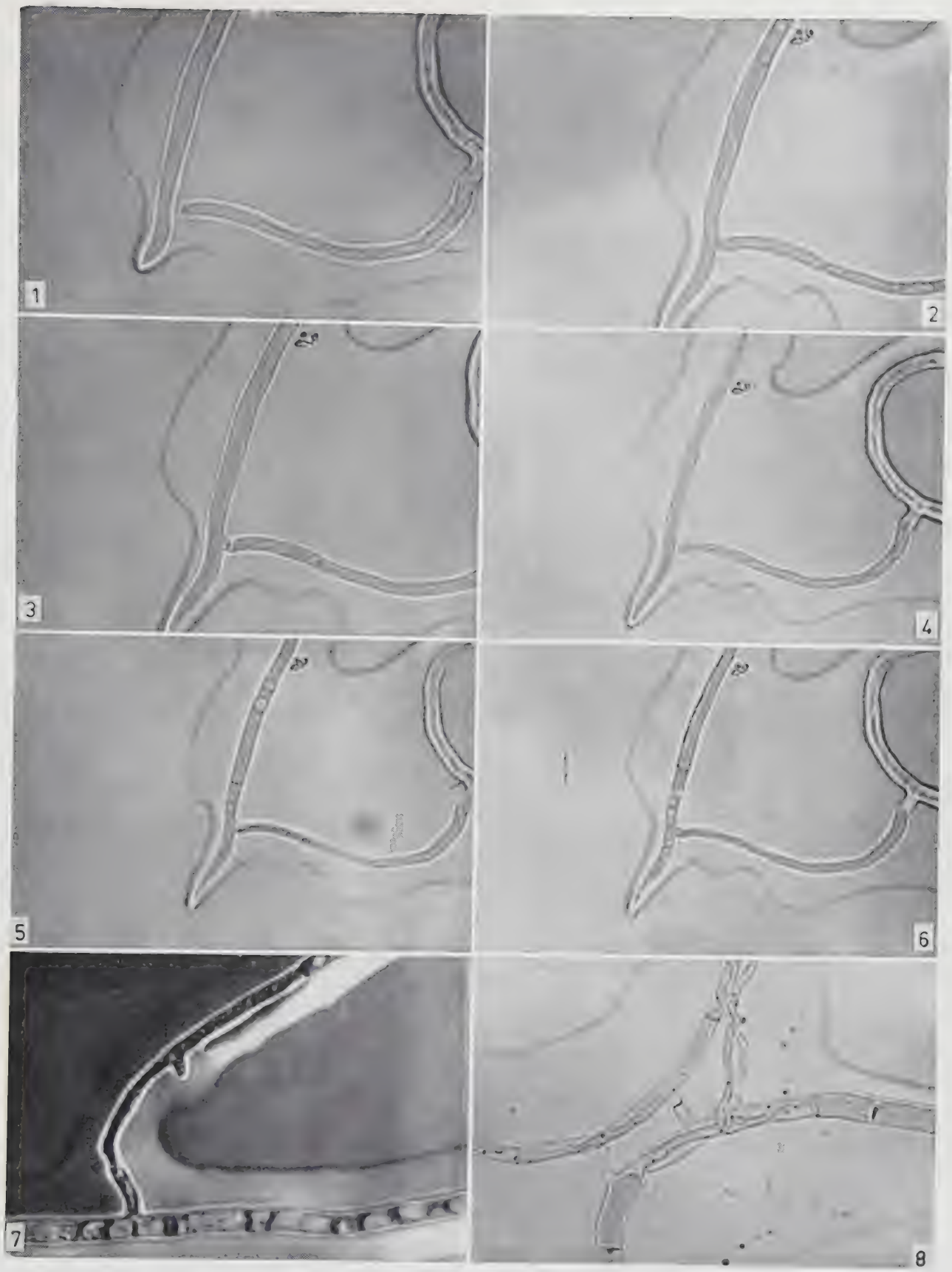


PLANCHE II

Deuxième Thèse

Propositions données par la Faculté :

« La notion d'épisomes »

Vu et approuvé :

Orsay, le 20 décembre 1961
Le Doyen de la Faculté des Sciences,

M. Zamansky

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean Roche